



INVESTOR IN PEOPLE

Application No: GB 0225833.3
Claims searched: 1-33

Examiner: Dr Jeremy Kaye
Date of search: 20 January 2003

Patents Act 1977 : Search Report under Section 17

Documents considered to be relevant:

Category	Relevant to claims	Identity of document and passage or figure of particular relevance
X	1-33	Biochem. Biophys Res. Comm., Vol.290, 2002, Ylera, F. et al., "Selection of RNA aptamers...", pp.1583-1588
X	1-33	WPI Abstract Accession No. 2000-657337 [64] & DE19916417 A1 (SCHERING AG) 19/10/2000 (see abstract)
X	29-33	WO 02/07762 A2 (SOMALOGIC, INC.) whole document
X	29-33	WO 01/09156 A1 (NEXSTAR PHARM., INC.) whole document
X	29-33	US 5475096 (GOLD ET AL.) whole document

Categories:

X	Document indicating lack of novelty or inventive step	A	Document indicating technological background and/or state of the art.
Y	Document indicating lack of inventive step if combined with one or more other documents of same category.	P	Document published on or after the declared priority date but before the filing date of this invention.
&	Member of the same patent family	E	Patent document published on or after, but with priority date earlier than, the filing date of this application.

Field of Search:

Search of GB, EP, WO & US patent documents classified in the following areas of the UKC^v:

--

Worldwide search of patent documents classified in the following areas of the IPC⁷:

C12N

The following online and other databases have been used in the preparation of this search report :

EPODOC, WPI, PAJ, BIOSIS, CAPLUS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, BLASTn,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

New amyloid-specific aptamer, useful for diagnosis and/or treatment of e.g. Alzheimer's disease, is stabilized against nucleases

Patent number: DE19916417
Publication date: 2000-10-19
Inventor: ERDMANN VOLKER A (DE); FUERSTE JENS PETER (DE); DAHMEN FRANCISCO YLERA (DE); SEILHEIMER BERND (DE)
Applicant: SCHERING AG (DE)
Classification:
- international: **C12N15/10; C12N15/11; C12N15/10; C12N15/11;** (IPC1-7): C07H21/00
- european: C12N15/10C4; C12N15/11D
Application number: DE19991016417 19990401
Priority number(s): DE19991016417 19990401.

Report a data error here

Abstract of DE19916417

Amyloid-specific aptamer (I) that is stabilized against nucleic acid-degrading enzymes, and its alleles and/or derivatives, is new. An Independent claim is also included for a method of preparing and/or isolating (I).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 16 417 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
C 07 H 21/00

⑳ Aktenzeichen: 199 16 417.7
㉔ Anmeldetag: 1. 4. 1999
㉕ Offenlegungstag: 19. 10. 2000

㉑ Anmelder:
Schering AG, 13353 Berlin, DE

㉒ Erfinder:
Erdmann, Volker A., Prof. Dr., 14163 Berlin, DE;
Fürste, Jens Peter, Dr., 13599 Berlin, DE; Dahmen,
Francisco Ylera, 14057 Berlin, DE; Seilheimer,
Bernd, Dr., 16540 Hohen Neuendorf, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:

DE 197 25 619 A1
DE 196 52 374 A1
DE 195 43 750 A1
US 58 34 188
US 57 56 291
WO 98 25 142 A1
WO 97 46 678 A1
WO 97 15 685 A1
WO 9 94 800 A1

J.Virol. 71(1997)8790-8797;
Chem.Abstr. 127(1997)203619x;
Chem.Abstr. 124(1996)137658;
Chem.Abstr. 114(1991)1664;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Amyloidspezifisches Aptamer

⑤⑦ Die Erfindung betrifft amyloidspezifische Substanzen.
Gelehrt wird ein gegen Nukleinsäure-spaltende Enzyme
stabilisiertes Aptamer, welches amyloid spezifisch ist,
oder Allele oder Derivate eines solchen Aptamers.

DE 199 16 417 A 1

DE 199 16 417 A 1

Die Erfindung betrifft amyloidspezifische Substanzen.

Amyloide bezeichnet im Rahmen der Erfindung unlösliche Peptide, welche sich insbesondere im extrazellulären Bereich eines Gewebes ablagern und so Plaques bilden können. Mit der Amyloid-Plaquerbildung gehen verschiedenste Krankheitsbilder einher, so beispielsweise insbesondere Alzheimer, Spongiforme Enzephalopathien und Typ II Diabetes Mellitus. Im Falle von Alzheimer kommt dem Amyloid β A4 besondere Bedeutung zu. Das β A4 ist ein Peptid aus 39–43 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 4 kDa. β A4 ist ein Fragment des sogenannten Amyloidvorläuferproteins APP (Amyloid Precursor Protein), welches ein Transmembran-Glycoprotein ist. APP wird von 3 unterschiedlichen Proteasen, den sogenannten α -, β - und γ -Sekretasen gespalten. Im Falle der α -Sekretasen entsteht ein lösliches APP-Fragment mit neuroprotektiven Eigenschaften. Im Falle der β - und γ -Sekretasen entsteht dagegen das β A4, welches außerhalb der Zellen zu löslichen Plaques aggregiert. Ähnliche Plaquerablagerungen wurden auch bei der Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington oder den Prionkrankheiten nachgewiesen.

Jedenfalls im Falle der Alzheimer-Krankheit beruht die Plaquerbildung letztendlich vermutlich auf Gendefekten, in denen der APP-Metabolismus so verändert wird, daß das β A4(1–42) und das β A4(1–40) Amyloid entstehen. Das β A4(1–40) lagert sich bevorzugt an den bereits gebildeten Keimen des extrem unlöslichen β A4(1–42) an und bildet so die eigentlichen Plaques. Die Amyloidablagerungen führen zu einer dauerhaften Mikrogliaaktivierung mit der Folge chronischer Entzündungen, wodurch auch gesunde Neuronen geschädigt werden. Aber auch Apoptose wird vermutlich durch β A4 ausgelöst. Apoptose führt zwangsläufig zum Schrumpfen des Gehirns, da Neuronen im Gegensatz zu anderen Zellen nicht mehr nachwachsen.

Aus pharmazeutischer und medizinischer Sicht ist es von besonderem Interesse, Substanzen zu entwickeln, mittels welcher β -Amyloide im Körper nachgewiesen werden können. Denn bisher konnte die Alzheimer-Krankheit nur durch Gespräche und Lerntests diagnostiziert werden, weshalb eine Therapie erst einsetzen konnte, wenn sich die Demenz bereits bemerkbar gemacht hat und der irreversible Abbau des Gehirns fortgeschritten ist. Mittels Substanzen, welche an β -Amyloide binden, könnte dem gegenüber sehr frühzeitig die Krankheit diagnostiziert und therapiert werden, so daß der Abbau des Gehirns verhindert oder zumindest erheblich verzögert wird. Auch für eine Therapie ist es wichtig, Substanzen zu finden, welche an β -Amyloide binden.

Substanzen der eingangs genannten Art sind bekannt aus der Literaturstelle DE 197 25 619 A1. Hierbei handelt es sich um relativ kurze Peptide, welche die Amyloidbildung hemmen. Nachteilig bei den insofern bekannten Substanzen ist, daß solche Peptide, insbesondere kurze Peptide, meist eine relativ geringe Affinität für Zielsubstanzen haben. Im Falle von kurzen Peptiden liegen die apparenten Dissoziationskonstanten typischerweise im μ Mol-Bereich. Ebenfalls bekannt sind monoklonale Antikörper gegen β A4, die eine Quantifizierung des Amyloids ermöglichen. Solche monoklonalen Antikörper sind jedoch nur mit sehr großem Aufwand, und zwar unter Einschluß von in-vivo Verfahrenstufen, herstellbar und folglich vergleichsweise teuer.

Demgegenüber liegt der Erfindung das technische Problem zugrunde, amyloidspezifische Substanzen zu finden, welche gleichzeitig hochaffin und einfach herstellbar sind.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung ein gegen Nukleinsäure-spaltende Enzyme stabilisiertes Aptamer, welches amyloidspezifisch ist, oder Allele und/oder Derivate eines solchen Aptamers. Als Aptamere sind Nukleinsäuren bezeichnet, welche an ein Protein als Zielmolekül binden. Dabei kann ein Aptamer eine DNA- oder eine RNA-Struktur aufweisen. Aptamere werden gegen Nukleinsäure-spaltende Enzyme stabilisiert durch Modifikation. Die Stabilisierung beruht auf der Affinität der modifizierten Aptamere praktisch nicht, verhindert jedoch die schnelle Zersetzung der Aptamere in einem Organismus durch RNasen oder DNasen. Ein Aptamer wird im Rahmen der Erfindung als stabilisiert bezeichnet, wenn die Halbwertszeit in biologischen Seren größer als eine Minute, vorzugsweise größer als eine Stunde, höchst vorzugsweise größer als ein Tag ist. Demgegenüber werden beispielsweise unmodifizierte RNA-Aptamere in Sekundenschnelle abgebaut. Allele sind Zustandsformen von Nukleinsäuren, welche durch Mutationen ineinander überführt werden können. Hierfür kommen in Frage: Translocation von affinen Teilsequenzen, Punktmutation innerhalb oder außerhalb einer affinen Teilsequenz, Deletion innerhalb oder außerhalb einer affinen Teilsequenz. Derivate bezeichnet chemische Abkömmlinge, die durch Abtrennung, Einführung oder Austausch von Atomen oder Atomgruppen eines oder mehrerer Nukleotide aus einer Nukleinsäure erhalten werden. Wesentlich ist, daß auch die Derivate und/oder Allele gegen Nukleinsäure-spaltende Enzyme stabilisiert und amyloidspezifisch sind. Die Eigenschaft des Allels oder Derivats kann jeweils für sich oder gleichzeitig vorliegen.

Ein erfindungsgemäßes Aptamer ist herstellbar durch folgende Verfahrensschritte: a) es wird ein randomisierter DNA-Pool geschaffen, b) aus dem randomisierten DNA-Pool wird ggf. ein RNA-Pool erzeugt und in einen Selektionskreislauf mit folgenden Schritten aufgegeben: c) an das Amyloid oder eine Teilsequenz des Amyloids bindende RNA des RNA-Pools bzw. DNA des DNA-Pools wird selektiert, d) selektierte RNA bzw. DNA wird amplifiziert, e) die RNA bzw. DNA aus Stufe d) wird dem RNA-Pool bzw. DNA-Pool in der Stufe c) zugegeben, wobei die Stufen c) bis e) sooft wiederholt werden, bis der Anteil in Stufe c) selektierter RNA bzw. DNA um weniger als 50%, vorzugsweise weniger als 10% ansteigt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein aus anderen Zusammenhängen bekanntes in vitro Verfahren zur Selektion von Aptameren. Zu den Verfahrensstufen ist im Einzelnen folgendes auszuführen. Für die Stufe a) kann eine Nukleinsäure-Bibliothek mit großer Komplexität erhalten werden mit chemisch-synthetisierten DNAs. Dazu wird mit Hilfe der automatischen Festplattensynthese eine randomisierte Sequenz synthetisiert, die von 2 konstanten Primerregionen mit beispielsweise 20 ± 5 Nukleotiden flankiert wird. Die Selektionen werden beispielsweise mit randomisierten Bereichen zwischen 30 und 80 Nukleotiden durchgeführt. Die beiden flankierenden konstanten Regionen dienen dazu, einzelsträngige DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zu Doppelstrang-DNA zu komplettieren und zu vervielfältigen. Durch Einsatz von Primern, die über den Hybridisierungsbereich hinausragen, ist es möglich, die DNAs weiter zu verlängern. Dadurch kann der Erkennungsbereich für die T7-RNA-Polymerase, der T7-Promotor, eingeführt werden, der für die ggf. anschließende Transkription von DNA in RNA benötigt wird (Stufe b). Die Selektion (Stufe c) kann mit Hilfe der Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Hierbei wird das Zielmolekül am Säulenmaterial im-

mobiliert, wodurch nichtbindende Aptamere abgetrennt werden. Es kann sich hierbei empfehlen, eine Vorsäule mit Säulenmaterial, jedoch immobilisiertes Zielmolekül herzustellen und vorzuschalten. Hierdurch wird eine Anreicherung von Säulenmaterial-affinen Aptameren verhindert. Es versteht sich, daß die Aptamere vor Aufgabe in den Selektionskreislauf gegebenenfalls renaturiert werden, damit sie in einer reproduzierbaren Konformation vorliegen. Zur Ablösung von selektierten Aptameren von der Affinitätschromatographiesäule empfiehlt es sich im Einzelnen die Affinitätselution zu verwenden. Dabei wird mit in Bindungspuffern gelöstem Zielmolekül eluiert. Eine andere Verfahrensweise ist die reversible Immobilisierung des Zielmoleküls. So kann das Zielmolekül z. B. über eine freie Sulfidgruppe unter Ausbildung von Disulfidbrücken an das Säulenmaterial gekoppelt werden. Nachdem die Aptamere gebunden haben, werden die Disulfidbrücken reduktiv gespalten, so daß das Zielmolekül zusammen mit dem Aptamer eluiert wird. Schließlich ist eine Elution mit einem denaturierenden Puffer möglich. Durch Denaturierung ändern die Aptamere ihre Konformation und werden vom Zielmolekül gelöst. Dies ist auch relativ unproblematisch, da Aptamere, anders als Proteine, leicht renaturierbar sind. Die Amplifikation (Stufe d) kann wie folgt durchgeführt werden. Das selektierte Aptamer wird gegebenenfalls durch reverse Transkriptionen in DNA umgeschrieben. In jedem Fall erfolgt die Amplifikation mittels der gut bekannten PCR-Methode, welche hier nicht im Detail näher erläutert werden soll. Nach der Amplifizierung erfolgt wiederum gegebenenfalls eine T7-Transkription zum Erhalt eines RNA-Aptamers, welches dann dem RNA-Pool wieder zugeführt wird. Dieser Vorgang wiederholt sich in Zyklen, wobei die affinen Aptamere exponentiell angereichert werden. Die Komplexität eines Startpools wird nach 5 Zyklen typischerweise um den Faktor 10^{10} – 10^{15} reduziert. So lassen sich Bibliotheken von 10^{15} und mehr unterschiedlichen Aptameren mit geringem Arbeitsaufwand und großer Effizienz durchsuchen. Bei einer Komplexität des Startpools von 10^{15} werden in der Regel 6–15 Selektionsrunden benötigt, um die gewünschten Aptamere anzureichern. Für die Identifizierung der Aptamere: werden in der Stufe d) DNAs des letzten Zyklus in Plasmide ligiert, kloniert und sequenziert. Die ermittelten Sequenzen werden miteinander verglichen, um Gemeinsamkeiten in der Primär- und Sekundärstruktur und damit die Bindungsmotive zu identifizieren. Auch ist es möglich, an den vorbeschriebenen Prozeß eine in vitro Evolution anzuschließen. Im Rahmen des vorstehenden Verfahrens sind die RNA-Aptamere wichtigerer, ebenso können auf entsprechende Weise selbstverständlich auch DNA-Aptamere hergestellt werden. Es entfallen dann die T7-Transkriptionen sowie die reverse Transkription.

Bei der Stabilisierung der Aptamere gegen Nukleinsäure-spaltende Enzyme kann grundsätzlich zwischen 2 Ansätzen unterschieden werden, nämlich die nachträgliche Modifikation der Aptamere und die Selektion mit bereits modifizierter RNA bzw. DNA. Der Vorteil der nachträglichen Modifikation ist die Durchführung der Selektion unter normalen Bedingungen. Dabei sollten allerdings in der Regel nicht alle Nukleotide, sondern nur ausgewählte Stellen der RNA bzw. DNA modifiziert werden, damit es zu keinen unerwünschten Veränderungen der Bindungseigenschaften kommt. Umgehen läßt sich dieses Problem, indem man die Modifikationen schon im Ausgangspool einführt. Es versteht sich, daß die modifizierten Bausteine von den während der Selektion verwendeten Enzyme (DNA-, RNA-Polymerasen) toleriert werden müssen. Im Einzelnen ist es bevorzugt, wenn die 2-Hydroxylgruppe der Zuckergruppe eines oder mehrerer Pyrimidin-Nukleotide durch eine Fluorid-, Amino- oder Methoxygruppe substituiert ist und/oder wenn in terminalen Phosphatgruppen ein Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom substituiert ist und/oder wenn das Aptamer ein Spiegelmer ist. In dem letzt genannten Fall erfolgt die Selektion der Aptamere gegen ein Enantiomeres Zielmolekül. Die insofern spiegelbildliche Nukleinsäure wird dann Spiegelmer genannt und bindet an das eigentliche Zielmolekül, kann aber, als in der Natur nicht auftretendes Molekül, von den Enzymen nicht erkannt und daher nicht abgebaut werden. Diese Methode läßt sich allerdings nur auf Zielmoleküle anwenden, die nicht chiral sind und bei denen das Enantiomer erhältlich ist.

Ein erfindungsgemäßes Aptamer zeichnet sich gegenüber Peptiden durch eine sehr hohe Affinität aus. Typischerweise werden apparente Dissoziationskonstanten im Bereich unter $1 \mu\text{Mol}$, insbesondere im Bereich 1 nmol – 100 nmol , erhalten, während kurze Peptide (< 30 Aminosäuren) typischerweise Werte im μMol -Bereich zeigen. Vorteilhaft gegenüber monoklonalen Antikörpern ist, daß die erfindungsgemäßen Aptamere lediglich in vitro-Selektionsmethoden erfordern, während die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern den Einsatz von Versuchstieren oder Zelllinien mit der Gefahr von unerwünschten Variationen erfordert. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern können Aptamere zudem chemisch synthetisiert werden, wodurch eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet ist. Auch ist der Einbau von Reportermolekülen an genau definierten Positionen im Rahmen der chemischen Synthese einfacher. Zudem lassen sich Aptamere erheblich einfacher als monoklonaler Antikörpern reversibel zu denaturieren. Schließlich ist aufgrund der in vitro Arbeitsweise die Entwicklung von Aptameren gegen Toxine oder wenig immunogene Substanzen möglich.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Aptamer gegen das Alzheimer β -Amyloid 4 (1–42) oder Teilsequenzen hiervon, insbesondere (1–40) spezifisch. Vorzugsweise handelt es sich um ein RNA-Aptamer. Im Falle eines gegen Alzheimer β -Amyloid 4 spezifischen erfindungsgemäßen Aptamers ist es bevorzugt, daß das Aptamer eine Loopstruktur aufweist. Die Loopstruktur kann insbesondere aus 4 Basen, vorzugsweise 4 Uridinen oder 3 Uridinen und einem Cytidin bestehen oder die genannten Basen aufweisen. Im Rahmen der Loopstruktur ist es bevorzugt, wenn die selektierte Sequenz eine Teilsequenz GUUU oder GUCU aufweist. Die Loopstruktur kann dann dadurch gebildet sein, daß dieser Sequenz gegenüberliegend eine Primersequenz AUUC liegt, wobei die jeweilig mittleren Basen ungepaart und jeweilig äußeren Basen gepaart sind. Im Einzelnen kann ein erfindungsgemäßes Aptamer eine Sequenz aufweisen aus der Gruppe bestehend aus den Sequenzen gemäß Patentanspruch 6.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Aptamers oder einer Mischung solcher Aptamere zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Alzheimer, Spongiformen Enzephalopathien, Typ II Diabetes Mellitus, Parkinson und Chorea Huntington. Im Falle des Diagnosemittels empfiehlt es sich, in an sich bekannter Weise markierte Atome und/oder Reportermoleküle in das Aptamer einzubauen. Es versteht sich, daß diese Atome bzw. diese Moleküle hinsichtlich Art und Position so ausgewählt und angeordnet werden, daß die Affinität des Aptamers zum Zielmolekül nicht oder nur geringfügig beeinflusst wird. Der Einsatz als Mittel zur Behandlung kann beispielsweise eine Modifikation der Aptamere derart umfassen, daß β -Amyloide komplexiert werden und so die Plaquebildung verhindert wird oder bereits gebildete Plaques abgebaut werden. Dann bewirken die Aptamere selbst eine Komplexierung oder sind so modifiziert, daß eine Komplexierung bewirkt wird, oder dienen als Vermittlersubstanzen für komplexierende Wirkstoffe.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsbeispielen darstellenden Experimenten näher erläutert.

1 Methoden

1.1 Chemische Nukleinsäuresynthese

1.1.1 Synthese des randomisierten DNA-Pools

- Der RNA-Pool für die Selektion wurde durch Transkription eines synthetisierten DNA-Pools erhalten. Der DNA-Pool wurde chemisch an der Festphase mit Hilfe eines Applied Biosystems Syntheseautomaten (PCR-Mate EP 391 und 394) hergestellt. Die Synthese beruht auf dem Phosphoramidit-Verfahren (Beaucage & Caruthers, 1981) und wurde unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Phosphoramidite mit dC-gekoppelten Säulenmaterial (CPG) der Porengröße 100 nm im 0,2 µmol-Maßstab durchgeführt. Die Phosphoramidite wurden in wasserfreiem Acetonitril gelöst (0,15 M).
- Die Kopplungszeit der Amidite wurde beim Standardsyntheseprotokoll von 15 s auf 35 s verlängert und die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe zu Anfang jedes Zyklus um 20% verkürzt.

- Der DNA-Template-Strang besteht aus einem 110mer, welches sich aus zwei flankierenden Primerregionen aus je 20 Basen und bekannter Sequenz sowie einer randomisierten Region von 70 Basen in der Mitte zusammensetzt. Für die Synthese der randomisierten Region wurde ein Amiditgemisch verwendet, bei dem die unterschiedliche Reaktivität der Amidite bereits berücksichtigt wurde. Das Verhältnis der 4 Amidite DA : dG : dT betrug 3 : 2, 5 : 2, 5 : 2.

- Die Abspaltung der Schutzgruppen nach beendeter Synthese sowie die Abspaltung vom Säulenmaterial erfolgte in 1,5 ml konz. Ammoniak (33%) für 24 h bei 55°C. Anschließend wurde der Ammoniak in einer Vakuumzentrifuge abgezogen und die DNA auf einem denaturierenden 8%-Polyacrylamidgel aufgereinigt, durch UV-Shadowing identifiziert, aus dem Gel eluiert und durch Ethanol-fällung entsalzt (siehe 1.2)

- Sequenz: 5'-d[CCA AGC TTG CAT GCC TGC AG-(N)₇₀-GGT ACC GAG CTC GAA TTC CC]-3'.

Bestimmung der Komplexität

- Die Komplexität wurde ermittelt, indem die Stoffmenge an DNA durch UV-Absorption bestimmt wurde (siehe 1.2.6). Da die Wahrscheinlichkeit, daß zwei gleiche DNA-Sequenzen synthetisiert wurden, extrem gering ist ($4^{70} = 1,4 \cdot 10^{42}$ verschiedene mögliche Sequenzen), wird davon ausgegangen, daß jede Sequenz unterschiedlich ist. Daraus folgt, daß die Stoffmenge an DNA gleich der Poolkomplexität ist.

- Da nicht jede Sequenz von der Polymerase während der PCR vervielfältigt wird, weil eine für das Enzym ungünstige Sequenz vorliegt bzw. nicht alle Schutzgruppen abgetrennt wurden, wurde ein PCR-Zyklus mit radioaktiv markierten dATP durchgeführt. Nach Abtrennung des überschüssigen dATPs durch Ethanol-fällung bzw. NAP-Säule kann durch Cerenkovzählung bestimmt werden, wieviel radioaktiv markierte DNA-Stränge synthetisiert wurden (siehe 1.2.7). Da die DNA-Ausgangskonzentration bekannt war, und nur maximal eine Kopie pro Molekül entstehen konnte, erhält man aus dem Verhältnis Ausgangskonzentration DNA zu radioaktiv markierter DNA den amplifizierbaren Anteil des hergestellten Pools. 60% des Synthesepools konnten hierbei von der Polymerase kopiert werden.

1.1.2 Synthese der Primer

- Die beiden Primer für die Vervielfältigung des DNA-Pools durch PCR wurden analog zur Synthese der DNA-Bibliothek durchgeführt. Die Synthese wurde im 1 µmol-Maßstab nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die Aufreinigung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurde Säulenmaterial mit einer Porengröße von 50 nm verwendet.

Primer A: 5'-d[TAA TAC GAC TCA TAG GGA ATT CGA GCT CGG TAC C]-3'

Primer B: 5'-d[CCA AGC TTG CAT GGC TGC AG]-3'

1.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

1.2.1 Gelelektrophorese

- Die gängigste Methode zur Aufreinigung von Nukleinsäuren ist die Gelelektrophorese. Sie beruht auf der Wanderung der geladenen Moleküle in einem elektrischen Feld. Man arbeitet hier bei einem pH-Wert von ca. 8,5 an dem die Nukleinsäuren als Polyanion vorliegen und zur positiv geladenen Anode wandern. Dabei macht man sich die von der Länge abhängige Mobilität der Nukleinsäure in einer Gelmatrix zunutze. Als Gelmatrix werden am häufigsten Agarose und Polyacrylamid verwendet. Während man mit Agarosegelen die Nukleinsäuren unter nativen Bedingungen auftrennt, kann mit Polyacrylamidgelen sowohl unter nativen als auch durch Zusatz von Harnstoff unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt werden. Agarosegele werden in der Regel bei Molekülgrößen von 100–20000 Basenpaaren verwendet, Polyacrylamidgele bei Molekülgrößen bis 500 Basen.

Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE)

- Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wird die Gelmatrix durch radikalische Polymerisation von Acrylamid mit N,N'-Methylenbis(acrylamid) als Quervernetzer hergestellt. Als Polymerisationsstarter dient Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Radikalstabilisator. Die Porengröße des Gels kann durch die Konzentration der Monomere sowie der Konzentration des Vernetzers eingestellt werden.

DE 199 16 417 A 1

Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Trennung von einzelsträngigen Nukleinsäuren arbeitet man unter denaturierenden Bedingungen, um die Ausbildung von Sekundär-Tertiärstrukturen, die zu unterschiedlichen Laufverhalten im Gel führen können, zu unterbinden. Dazu gibt man 7 M Harnstoff zu dem Polymerisationsansatz.

Die Trennung erfolgt auf einem 21,5 x 19 cm Gel mit einer Dicke von 1 mm bei 70 mA in 1 x TBE-Puffer. Ansätze:

Acrylamidkonz.:	6%	8%	10%	12%
Acrylamid/				
Bisacrylamid (40%/2%):	7,5ml	10ml	12,5ml	15ml
5 x TBE:	10ml	10ml	10ml	10ml
Harnstoff:	21g	21g	21g	21g

Der Ansatz wird auf 50 ml mit Wasser aufgefüllt und die Polymerisation durch Zusatz von 300 µl APS (10%) und 30 µl TEMED gestartet. Nach 45 min Polymerisation wird das Gel für mind. 15 min bei 600 V vorlaufen gelassen, damit sich eine konstante Temperatur einstellen kann.

Die Proben werden mit dem gleichen Volumen Formamid versetzt. Der Verlauf der Elektrophorese kann durch die Benutzung einer Lösung der beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol in Formamid beobachtet werden.

Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Trennung doppelsträngiger DNA wird unter nativen Bedingungen durchgeführt. Dabei geht man wie oben beschrieben vor, jedoch entfällt der Zusatz von Harnstoff. Die Proben werden mit dem gleichen Volumen an nativem Probenpuffer versetzt. Im Gegensatz zur denaturierenden PAGE darf das Gel bei der nativen PAGE nicht zu warm werden (Denaturierung der DNA). Deshalb wird bei einer Spannung von 300-400 V aufgetrennt.

Sequenzgele

Für die Auftrennung der Produkte der radioaktiven Sequenzierung wurden 6%ige denaturierende Gele verwendet. Diese Gele mit den Maßen 42 x 33 cm sind lediglich 0,4 mm dick. Damit nach beendeter Elektrophorese das Gel auf einer Glasplatte haftet, und man die andere Platte abnehmen kann, ist eine spezielle Behandlung der beiden Glasplatten notwendig.

Dazu wird auf der großen, haftenden Glasplatte eine Lösung aus 200 µl Silan A-174 (Methacryloxypropyltrimethoxysilan, Pharmacia) und 1 ml Eisessig in 20 ml Ethanol mit einem fusselfreiem Papiertuch gleichmäßig verteilt. Diese Prozedur wiederholt man 20 min später. Nach 60 min wird die Platte gründlich mit Ethanol abgerieben und für mindestens 60 min getrocknet. Die kleine, nicht haftende Glasplatte wird mit einer 2%igen Lösung aus Dichlordimethylsilan in 1,1,1-Trichlorethan (Repel-Silan, Pharmacia) solange eingerieben, bis die Lösung in Form kleinster Tröpfchen auf der Glasplatte abperlt. Diese Prozedur wurde nach 30 min wiederholt, und nach weiteren 60 min wurde die Platte gründlich mit Wasser abgerieben und für mindestens 60 min trocknen gelassen.

Gellösung: 42 g Harnstoff, 12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (40%/2%), 20 ml 5 x TBE, ad 100 ml mit H₂O auffüllen. Vor Zugabe von APS und TEMED wird der Polymerisationsansatz noch einmal über einen Faltenfilter filtriert. Man läßt das Gel mindestens 45 min polymerisieren und anschließend für 30 min bei 55 W vorlaufen. Unter Verwendung eines sogenannten "Haifischkamms" können 48 ³⁵S-markierte Proben (= 12 Sequenzierungen) auf das Gel aufgetragen werden.

Nach beendeter Elektrophorese wird die kleine Glasplatte vorsichtig abgehoben. Das Gel auf der großen Glasplatte wird zum Eluieren des Harnstoffs für 6 min mit dest. Wasser gespült und anschließend im Trockenschrank bei 60°C für 30 min getrocknet. Anschließend kann für die Autoradiographie ein Röntgenfilm aufgelegt werden. Man exponiert den Film für mindestens 12 h auf dem Gel.

Bei der Verwendung eines ABI-Sequencer entfällt die Vorbehandlung der Glasplatten. Hier werden die Glasplatten vor der Benutzung in den Sequencer eingesetzt und überprüft, daß keine Grundabsorption aufgrund von Verunreinigungen vorhanden ist. Man läßt 1 h bei 55 W vorlaufen. Da die Proben mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, entfällt die Nachbehandlung des Gels. Nach abgeschlossener Elektrophorese werden am Computer die Banden den Proben zugeordnet und die Analysesoftware gestartet.

Gele für die Spaltungsanalyse

Für die Sekundärstrukturanalyse der Aptamere durch enzymatische RNA-Spaltung wurden 25%ige denaturierende Polyacrylamidgele verwendet (42 x 33 cm, 0,4 mm Dicke). Hier wurden die beiden Monomere Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 50 : 2 eingesetzt. Eine Vorbehandlung der Glasplatten ist aufgrund der höheren Stabilität des Gels nicht notwendig. Man läßt für 60 min bei 1500 V vorlaufen und trennt die Proben anschließend bei 55 W auf. Nach beendeter Elektrophorese wird eine Glasplatte abgehoben und das Gel auf einen alten Röntgenfilm transferiert und in Frischhaltefolie eingewickelt. Anschließend kann für die Autoradiographie ein Röntgenfilm aufgelegt werden.

Gellösung: 42 g Harnstoff, 50 ml Acrylamid/Bisacrylamid (50%/2%), 20 ml 5 x TBE.

Agarosegelelektrophorese

Agarosegele werden zur Auftrennung großer DNA-Moleküle unter nativen Bedingungen verwendet. In dieser Arbeit wurden sie zur Analyse der Produkte nach der PCR sowie der Analyse der Plasmid-DNA aus Minipräparationen verwendet. Die Porengröße kann durch Verändern der Agarosekonzentration variiert werden und ist abhängig von der verwendeten Agarose (Kettenlänge).

2% (w/v) Agarose wird in einem Erlenmeyerkolben in 1 × TBE-Puffer in der Hitze gelöst (Mikrowelle). Man läßt den Ansatz auf ca. 50°C abkühlen und gibt dann für die Detektion der DNA 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) auf 100 ml Ansatz zu und gießt das Gel. Nach dem Erkalten des Gels können die Proben, die mit dem gleichen Volumen nativen Probenpuffer versetzt wurden, aufgetragen und bei 100–110 V elektrophoretisiert werden. Es wurden Flachgelkammern von BioRad (Mini und Wide Mini Sub DNA Cells) verwendet.

Gelelution von Nukleinsäuren

Die durch UV-Shadowing bzw. Autoradiographie detektierte ausgeschnittene Gelbande wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Wasser und 40 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,5) versetzt. Man schüttelt bei 4°C für mindestens 12 h oder bei 70°C für 1 h und gibt das Eluat in ein neues Eppendorfgefäß. Durch Ethanolfällung oder Gelfiltration kann die Lösung von Harnstoff und Salzen befreit werden.

1.3.2 Nachweismethoden für Nukleinsäuren in Gelen

Ethidiumbromidfärbung

Die Verwendung von Ethidiumbromid ist die schnellste und gebräuchlichste Methode für den analytischen Nachweis von Nukleinsäuren, Ethidiumbromid ist ein heterozyklischer, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der in die Nukleinsäuren interkaliert wird. Die Arbeiten mit dem Farbstoff sollten sorgfältig durchgeführt werden, da Ethidiumbromid stark mutagen ist. Polyacrylamidgele werden für 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) in 1 × TBE angefärbt. Bei Agarosegelen wurde das Ethidiumbromid bereits zu der Gellösung zugesetzt. Auf einem Transilluminator kann man bei 306 nm Durchlicht die Nukleinsäuren als leuchtende Banden erkennen.

UV-Shadowing

Bei der präparativen Aufreinigung von Nukleinsäuren möchte man Wechselwirkungen mit Farbstoffen umgehen. Für den Nachweis macht man sich die Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm zunutze. Dazu wird das Gel auf eine in Frischhaltefolie eingewickelte Dünnschichtchromatographieplatte gelegt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (60 F₂₅₄) behandelt wurde. Durch aufgestrahltes UV-Licht (254 nm) kann man die Nukleinsäuren als dunklen Schatten erkennen und Ausschneiden. Um eine Schädigung der Nukleinsäuren durch das UV-Licht zu vermeiden, sollte dieser Schritt möglichst schnell durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Methode ist ihre geringe Empfindlichkeit. (0,5–1 A₂₆₀), weshalb sie vor allem bei präparativen Aufreinigungen benutzt wird.

Autoradiographie

Radioaktiv markierte Nukleinsäuren (³²P oder ³⁵S) können in Gelen, je nach ihrer spezifischen Aktivität, in geringsten Mengen durch Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms nachgewiesen werden (<fmol).

Gele mit ³²P-markierten Oligonukleotiden werden nach Abnehmen einer Glasplatte in Frischhaltefolie eingewickelt. Möchte man die Nukleinsäuren aus dem Gel ausschneiden und eluieren, wird das Gel mit drei phosphoreszierenden Punkten markiert. In einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie (Kodak) legt man einen Röntgenfilm (Fuji) auf das Gel. Je nach Menge und spezifischer Aktivität der Nukleinsäure exponiert man den Film für 5 min bis 24 h. Bei längeren Expositionszeiten friert man die Kassette bei -80°C ein, um eine Diffusion der Oligonukleotide zu verhindern.

Sequenzgele mit ³⁵S-markierten Nukleinsäuren werden nach der Elektrophorese auf der großen Glasplatte getrocknet. Anschließend wird ein Röntgenfilm auf dem trockenen Gel bei Raumtemperatur für 1 bis 2 Tage exponiert.

Die exponierten Filme werden entwickelt (1–2 min. Röntgenentwickler G150, Agfa-Gefaert N.V.), fixiert (3 min, Röntgenfixierer G350, Agfa-Gefaert N.V.), gewässert (5 min) und getrocknet.

Möchte man die Nukleinsäuren eluieren, so schneide man die schwarzen Banden auf dem Röntgenfilm aus, legt den Film so auf das Gel, daß die 3 Marker mit den schwarzen Punkten auf dem Film übereinstimmen, schneidet die Banden aus und eluiert wie oben beschrieben.

1.2.3 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration können Nukleinsäurelösungen von Salzen und anderen niedermolekularen Verbindungen abgetrennt werden. Man macht sich dabei das unterschiedliche Permeationsverhalten der Moleküle in die Poren des Gelbetts zunutze (Gelpermeationschromatographie). Die großen Moleküle können im Gegensatz zu den kleinen nicht in die Poren des Säulenmaterials eindringen und werden deshalb sofort eluiert. Verwendet wurden vorgefertigte Säulen der Firma Pharmacia mit Sephadex G-25 (NAP-5, NAP-10, NAP-25) oder G-50 (NICK). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

1.2.4 Ethanolfärbung

Nukleinsäuren können aus wässriger Lösung durch Ethanol in Anwesenheit von Natriumacetat bei pH 5,5 präzipitiert werden, während Salze und andere Verunreinigungen in Lösung bleiben. Dazu wird die Nukleinsäurelösung mit 1/10 des Volumens einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,5) und dem 2,5fachen Volumen an Ethanol versetzt und für 10 min auf -20°C gestellt. Anschließend zentrifugiert man 30 min bei 10000–14000 Upm/ 4°C , verwirft die überstehende Ethanol-lösung, wäscht das Pellet mit 400 μl 70% Ethanol und zentrifugiert weitere 5 min. Man nimmt den Überstand ab und trocknet das Pellet bei Raumtemperatur. Bei sehr kleinen Nukleinsäuremengen kann die Präzipitation durch die Zugabe von Glycogen verbessert werden. Die nach den Selektionsrunden eluierte RNA wurde grundsätzlich für 1 h bei -20°C in Anwesenheit von 40 μg Glycogen gefällt.

1.2.5 Phenol- und Chloroformextraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen Lösungen z. B. nach Enzymreaktionen, zur Trennung des Peptid-RNA-Komplexes nach der Selektion oder bei der Isolierung von Plasmiden aus Zellen, versetzt man die Lösung mit dem gleichen Volumen Tris-gesättigten Phenols (pH 8,0) und vortex kräftig. Man trennt die beiden Phasen durch Zentrifugation bei 3000 Upm und nimmt die wässrige obere Phase vorsichtig ab. Die phenolische Phase kann noch einmal mit dem halben Volumen Wasser versetzt werden, geschüttelt und zentrifugiert werden. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zweimal mit dem doppelten Volumen Chloroform extrahiert, um restliches Phenol aus der wässrigen Lösung zu entfernen. Schon geringe Spuren Phenol können nachfolgende Enzymreaktionen beträchtlich einschränken oder sogar komplett inhibieren.

1.2.6 Messung der Radioaktivität

Die radioaktive Markierung von Nukleinsäuren ist eine praktische Methode, um selbst kleinste Mengen noch detektieren zu können. Die Quantifizierung erfolgt bei ^{32}P -Markierung durch Cerenkov-Zählung. Dazu wird das Eppendorfgefäß mit der Probe in einem Szintillationsröhrchen im Szintillationszähler (LS 6000 SC, Beckman) mit Programm 1 (^{32}P , Cerenkov-Zählung) eine Minute vermessen. Man erhält die Ergebnisse in cpm (counts per minute).

1.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Aufgrund des Absorptionsmaximums der Basen der Nukleinsäuren im UV-Bereich bei 260 nm kann mit einem Photometer die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen bestimmt werden. Näherungsweise gelten folgende Gleichungen:

ssDNA: Anzahl der μmole = Ges. $\text{OD}_{260}/(10 \text{ Anzahl der Basen})$

dsDNA: 1 OD = 50 μg

pmol = $\mu\text{g} \cdot 1000000/(2 \cdot \text{Anzahl der Basen} \cdot 325)$

RNA: 1 OD = 40 μg

pmol = $\mu\text{g} \cdot 1000000/(\text{Anzahl der Basen} \cdot 337)$

1.3 Molekularbiologische Methoden

1.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von DNA. Es werden neben der zu amplifizierenden DNA zwei 15–30 Basen lange Oligonukleotide (Primer) mit definierter Sequenz benötigt, die zu den 3'-Enden des DNA-Templates bzw. dessen Gegenstrang komplementär sind. Nach einem Denaturierungsschritt hybridisieren diese Primer in einem Primer-Annealing-Schritt mit dem zu amplifizierenden DNA-Template. Dabei wird die Annealing-Temperatur so hoch gewählt, daß keine unspezifische Hybridisierung auftritt. Mit einer thermostabilen DNA-Polymerase erfolgt im Extensionsschritt die Verlängerung des Primers entlang des Templates in 5'-3'-Richtung. Im Idealfall erhält man so aus jedem DNA-Doppelstrang zwei neue DNA-Stränge. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser drei Schritte (bis zu 30 Zyklen) erhält man eine exponentielle Zunahme der DNA.

Als DNA-Template kann sowohl doppel- als auch einzelsträngige DNA eingesetzt werden. Durch Verwendung von überhängenden Primern kann eine Verlängerung der DNA erreicht werden. Dies wurde für die Einführung des T7-Promotors in die chemisch synthetisierte DNA ausgenutzt. Alle Reaktionen wurden mit der Pfu Polymerase durchgeführt, die sich von der Taq Polymerase durch ihre Proof-Reading-Aktivität und ihre Exonukleaseaktivität unterscheidet, die für eine niedrigere Fehlerrate sorgt. Im Anschluß an die PCR wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Ethanolfällung durchgeführt, um die Pfu Polymerase (mit der Exonukleaseaktivität) zu entfernen.

Standardansatz

10 μl 10 \times Pfu-Puffer
4,8 μl MgCl_2 (100 mM)
0,5 μl BSA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
4 μl Primer A (100 μM)
4 μl Primer B (100 μM)
4 μl dNTP-Mix (10 mM je dNTP)

Temperaturbedingungen

$94^{\circ}\text{C}/4$ min Init.denat.
 $94^{\circ}\text{C}/2$ min Denaturierung
 $55^{\circ}\text{C}/2$ min Annealing
 $75^{\circ}\text{C}/6$ min Extension
12–20 Zyklen

Standardansatz

1 µg DNA-Template
1 µl Pfu Polymerase (2,5 U/µl)
ad 100 µl mit H₂O auffüllen

Temperaturbedingungen

5

Präparative PCR

Für die Amplifikation der synthetisierten DNA-Bibliothek wurde die Reaktion nicht in PCR-Reaktionsgefäßen, sondern in 10 ml Glasgefäßen durchgeführt (6 × 5 ml), die in drei Wasserbädern entsprechender Temperatur geschwenkt wurden. Aufgrund des großen Volumens wurden die Reaktionszeiten verlängert und die Temperaturen um 2°C erhöht und die Zyklenzahl auf 10 beschränkt. Ferner wurde die Dauer der letzten Extensionphase verdoppelt.

präparativer Ansatz

300 µl 10 × Pfu-Puffer
1440 µl MgCl₂ (100 mM)
15 µl BSA (20 µg/µl)
1200 µl Primer A (120 nmol)
1200 µl Primer B (120 nmol)
480 µl dNTP-Mix (100 mM je dNTP)
30 µl Pfu Polymerase
ad 30 ml mit H₂O auffüllen.

Temperaturbedingungen

96°C/4 min Init.denat.
96°C/5 min Denaturierung
56°C/5 min Annealing
77°C/12 min Extension
10 Zyklen
75°C/12 min Zusatzext.

Im Anschluß an die PCR wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine Probe (30 µl) über ein 8% denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt, eluiert und entsalzt. Durch Vergleich der Absorption bei 260 nm vor und nach der Aufreinigung kann die Konzentration des Pools berechnet werden.

PCR nach reverser Transkription

30

Der Ansatz der reversen Transkription wurde auf vier 100 µl Ansätze verteilt. Die Zeiten der drei Schritte wurden etwas verlängert, um auch die Vervielfältigung schlecht amplifizierbarer DNA-Sequenzen zu gewährleisten. Die Anzahl der Zyklen wurde an die Menge an eluierte RNA nach der Selektion angepaßt. Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion und der Ethanol-fällung wurde die DNA in 200 µl Wasser gelöst.

35

Reaktionsansatz

20 µl aus rev. Transkription
40 µl 10 × Pfu-Puffer
19,2 µl MgCl₂ (100 mM)
16 µl Primer A (100 µM)
16 µl Primer B (100 µM)
2 µl BSA (2 µg/µl)
16 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP)
4 µl Pfu Polymerase
ad 400 µl mit H₂O auffüllen

Temperaturbedingungen

94°C/4 min Init.denat.
94°C/2 min Denaturierung
55°C/2 min Annealing
75°C/10 min Extension
6–16 Zyklen

45

PCR zur Amplifikation klonierter Sequenzen

Nach der Klonierung und Isolierung der Plasmide wurde die Insert-Sequenz durch PCR aus dem vollständigen Vektor heraus amplifiziert. Die Aufreinigung erfolgt wie oben beschrieben.

Standardansatz

40 µl 10 × Pfu-Puffer
19,2 µl MgCl₂ (100 mM)
2 µl BSA (2 µg/µl)
16 µl Primer A (50 µM)
16 µl Primer B (50 µM)
16 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP)
2 µl Vektor (1/10 Volumen der Minipräp)
4 µl Pfu Polymerase (2,5 U/µl)
ad 400 µl mit H₂O auffüllen

Temperaturbedingungen

94°C/4 min ID
94°C/2 min Denaturierung
94°C/2 min Annealing
75°C/6 min Extension
25 Zyklen

60

65

1.3.2 T7-Transkription

Mit Hilfe der in vitro-Transkription kann eine zu einer DNA-Sequenz komplementäre RNA hergestellt werden. Dazu muß die DNA-Matrize einen 3'-terminalen Erkennungsbereich aus 17 Basen, den T7-Promotor, enthalten. Unmittelbar

hinter diesem Promotor wird die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 gestartet. Man kann die Effizienz der Polymerase erhöhen, indem man das Transkript mit zwei Guanosinnukleotiden beginnen läßt.

Standardansatz:

10 µl 10 × Transkriptionspuffer
10 µl DTT (100 mM)
6 µl BSA (2 µg/µl)
16 µl NTP-Mix (100 mM je NTP)
50 µl DNA-Matrize (ca. ¼ eines PCR-Ansatzes)
2 µl T7-Polymerase (50 U/µl)
ad 100 µl mit H₂O auffüllen.

Durch Zugabe von α-³²P-CTP kann die RNA radioaktiv markiert werden. Nach 2–3 h Inkubation bei 37°C wird die RNA auf einem 6% denaturierenden Polyacrylamidgel aufgereinigt, eluiert und durch Ethanolfällung entsalzt. Nach der Ethanolfällung wurde nur noch mit silikonisierten Eppendorfgefäßen gearbeitet, um einen Verlust der RNA durch Adsorption an der Gefäßwand zu minimieren.

Präparative Transkription

Zur Herstellung des RNA-Startpools für die Selektion wurde eine präparative Transkription mit 3,8 ml Volumen angesetzt (19 × 200 µl). Außerdem wurde die DNA-Konzentration erhöht auf 40 µmol/100 µl Ansatz. Es wurden 1,6 nmol DNA eingesetzt, entsprechend einer Pool-Komplexizität von 1×10^{15} . Die Reaktionszeit wurde auf 5 h erhöht.

Präparative Transkriptionsansatz:

320 µl DNA-Pool (1,6 nmol)
380 µl 10 × Transkriptionspuffer
380 µl DTT (100 mM)
22,5 µl BSA 120 µg/µl
600 µl NTP-Mix (100 mM je NTP)
10 µl α-³²P-CTP
75 µl T7-Polymerase
ad 3,8 ml mit H₂O auffüllen.

Soll radioaktiv markierte RNA durch Zugabe von α-³²P-CTP hergestellt werden, so nimmt man von dem Reaktionsansatz ein kleines Aliquot (1/50 des Ansatz) als Vergleichswert ab, um die spezifische Radioaktivität der RNA bestimmen zu können. Die Radioaktivität in dieser Probe entspricht 1/50 der zugesetzten Menge an CTP. Die Stoffmenge des zugesetzten radioaktiven CTPs ist aufgrund der hohen Aktivität vernachlässigbar gering. Aus der Aktivität der Vergleichsprobe $\text{cpm}_{\text{Vergleich}}$ und der eigentlichen Probe $\text{cpm}_{\text{Probe}}$ kann man die Stoffmenge des eingebauten Cytidins n_C in der Probe berechnen. Durch Division durch die Anzahl der Cytidinnukleotide in der RNA erhält man die Stoffmenge der RNA n_{RNA} . Zur Berechnung der Anzahl der Cs geht man im randomisierten Bereich davon aus, daß jede vierte Base ein Cytidin ist. Zuzüglich der Cyticlinbasen in den beiden Primerregionen sind statistisch 31,5 Cs in der RNA enthalten.

1.3.3 Reverse Transkription

Für eine spätere Amplifikation durch PCR wurde die RNA nach jeder Selektionsrunde mit der Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurde eine Transkriptase mit einer RNase H-Deletion, d. h. die RNA wird bei der Transkription nicht verdaut, und es ist möglich, mehrere DNA-Kopien von einem RNA-Strang herzustellen. Ähnlich wie bei der PCR wird auch hier ein zum 3'-Ende komplementäres Oligonukleotid benötigt, um ein DNA-RNA-Hybrid zu bilden, welches anschließend von der Reversen Transkriptase verlängert wird.

Hybridisierung

10 µl RNA (selektiert)
2 µl Primer B (100 µM)
Inkubation bei 70°C/10 min

Reverse Transkription

12 µl Annealingansatz
4 µl 5 × RT-Puffer
2 µl DTT (100 mM)
1 µl dNTP-Mix (10 mM/dNTP)
1 µl Rev.Trans. (200 U/µl)

Inkubation bei 46°C/2 min

Man inkubiert eine Stunde bei 46–48°C und fährt dann sofort mit der PCR fort (1.3.1).

1.3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgt durch Anlagerung eines Sequenzierungsprimers an die einzelsträngige DNA, der dann von einer DNA-Polymerase entlang des Plasmids verlängert wird. Durch Zugabe von Didesoxyribonukleotiden, an die keine weiteren dNTPs gekoppelt werden können, kommt es statistisch zu einem Abbruch der Kettenverlängerung hinter jeder einzelnen Base.

Bei der radioaktiven Sequenzierung mit ^{35}S wird zusätzlich zu den dNTPs auch noch ^{35}S -dATP (oder ^{35}S -dCTP) eingebaut, um eine Detektion durch Autoradiographie zu ermöglichen.

- Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenzierungs-Kit der Firma Pharmacia durchgeführt. Durch Verwendung des Universal- und des Reverse-Primers wird sowohl der Strang als auch der Gegenstrang sequenziert, wodurch man eine fehlerhafte Sequenzierung z. B. durch Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur besser erkennen kann. Damit die DNA einzelsträngig vorliegt, wird sie im ersten Schritt denaturiert. Nach der Hybridisierung des Primers wird die Probe für die Sequenzierungsreaktion auf vier Eppendorfgläser entsprechend der vier Basen verteilt und das jeweilige Dideoxynukleotid zugegeben. Man läßt genau 5 min bei 37°C reagieren und bricht die Polymerisation durch Zugabe der Stop-Lösung auf Eis ab. Die Hälfte jeder Probe wird zur Auftrennung auf ein 6%-Sequenzierungsgel aufgetragen (siehe 3.2.1). Von dem Gel wird ein Autoradiogramm erstellt, auf dem die jeweilige Sequenz abgelesen werden kann.

1.) Denaturierung

- 15 10 µl Plasmid-DNA
2,5 µl NaOH (2 M, frisch)
Inkubation für 10 min/RT

2.) Hybridisierung

- 10 µl Plasmid, denat.
2 µl Annealing-Puffer
2 µl Primer (5 pmol/µl)
Inkub. 20 min/ 37°C und 10 min/
kT

20

- 3,75 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,5)
8,75 µl H_2O
75 µl Ethanol

- 25 Ethanolfällung, Aufnehmen in 10 µl H_2O

3.) Markierung

- 14 µl Annealing-Ansatz
3 µl Labelling-Mix (A-Mix)
30 1 µl [α - ^{35}S]-dATP (10 µCi/µl)
2 µl T7-DNA Polym. (1,5 U/µl)
4 min/RT

4.) Abbruchreaktion

- 2,5 µl je A, C, G oder T-Mix
4,8 µl Labelling-Ansatz
37°C/5 min
6 µl Stop-Lösung

35

Sequenzierung mit dem ABI-Sequencer

Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgt beim ABI-Sequencer durch Fluoreszenzmessung. Dazu arbeitet man mit Dideoxynukleotiden, die mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert wurden und daher bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszieren. Dadurch muß die Reaktion und die Auftrennung auf dem Gel für die einzelnen Basen nicht getrennt durchgeführt werden, wodurch sich die Zahl der Proben um 75% verringert. Die Sequenzierung wurde mit dem Kit von Perkin-Elmer nach der Methode des Cycle-Sequencing im Thermocycler durchgeführt. Wie bei einer normalen PCR bildet die Polymerase den Gegenstrang zur Template-DNA, nur daß beim Cycle-Sequencing lediglich ein Primer vorhanden ist, also nur ein Strang vervielfältigt wird, und daß durch Einbau der ddNTPs die Kettenverlängerung statistisch an jeder Stelle des Templates abgebrochen wird. Dadurch verringert sich die benötigte Menge an DNA auf 1/10 einer Plasmidisolierung.

Sequenzierungsansatz

- 5 µl Plasmid
5 µl Primer (5 µmol/µl) universal/reverse
50 10 µl Sequenzierungsmix

Temperaturbedingungen

- 96°C/2 min Init.denat.
96°C/15 sec Denat.
50°C/15 sec Annealing
60°C/4 min Extension
25 Zyklen

55

Da der Überschuß der fluoreszenzmarkierten ddNTPs bei der fluorometrischen Analyse stört, werden diese durch Gel-filtration mit Spin Columns vorher abgetrennt. Dabei wurden CentriSep (Princeton Separation) bzw. Centriflex (Advanced Genetic Technologies Corp.) Spin Columns entsprechend der Anleitung verwendet. Die Centriflex-Säulen haben den Vorteil, daß sie bereits vorgequollen sind und daher direkt einsatzbereit sind. Eine Abtrennung der ddNTP durch eine Ethanol-fällung ist ebenfalls möglich. Das ist gerade bei einer großen Anzahl von Proben schneller und kostengünstiger, jedoch gelingt die Abtrennung der ddNTPs nicht quantitativ, weshalb die Auftrennung der ersten 20 Basen auf dem Sequenzgel nicht sauber gelingt. Da aber die Sequenzierungsprimersequenz in einem größeren Abstand von dem Insert liegt, ist dies kein großer Nachteil. Die gereinigten Proben werden in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingedunstet und in 2 µl Probenpuffer gelöst. 1–1,5 µl dieser Probe werden anschließend auf das 6% denaturierende Sequenzierungsgel aufgetragen. Nach beendeter Elektrophorese erfolgt die Zuordnung der Proben sowie die Überprüfung der Auswertung des Computers.

1.3.5 3'-Markierung von RNA

Die radioaktive 3'-Markierung erfolgt durch Veresterung der freien 3'-Hydroxylgruppe der RNA mit der 5'-Monophosphatgruppe eines Cytidin-3'-[5'-³²P]-diphosphats (pCp). Diese Ligation wird durch die T4-RNA-Ligase unter ATP-Hydrolyse katalysiert.

Nach einer 18-stündigen Inkubation bei 4°C wird der Reaktionsansatz über ein 12%iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt, eluiert und mit Ethanol gefällt.

Reaktionsansatz:

12 µl RNA (2 µmol/µl)
12 µl 3 × Ligase-Puffer
3 µl ATP (150 µM, frisch verdünnt)
10 µl [5'-³²P]pCp
3 µl T4-RNA-Ligase (10 U/µl)

1.3.6 5'-Markierung von RNA

Die Markierung des 5'-Endes der RNA erfolgt durch Kinasierung einer radioaktiven Phosphatgruppe an die 5'-Hydroxylgruppe. Dazu muß zuerst die nach der Transkription vorhandene Triphosphatgruppe der RNA mit Hilfe der alkalischen Phosphatase abgespalten werden. Es wurde die alkalische Phosphatase aus Shrimps verwendet, da sie durch Erhitzen auf 80°C für 10 min für die anschließende Kinasierung inaktiviert werden kann. Die T4-Polynukleotid-Kinase kann nun den radioaktiven Phosphatrest vom [γ-³²P]-ATP auf die RNA übertragen. Nach beendeter Reaktion reinigt man über ein 12%iges denaturierendes Polyacrylamidgel auf und fällt die RNA mit Ethanol.

Dephosphorylierung:

7 µl RNA (2 µmol/µl)
1 µl 10 × Phosphatase-Puffer
2 µl alkalische Phosphatase, Shrimps (1 U/µl)
Inkubation bei 37°C/1 h
3 µl EDTA (0,1 M)
80°C/10 min. anschließend 0°C/5 min

Kinasierung:

23 µl Dephosphorylierungsansatz
3 µl H₂O
5 µl 10 × Kinase-Puffer
1,6 µl DTT (100 mM)
3 µl MgCl₂ (100 mM)
10 µl [γ-³²P]-CTP
4 µl T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl)

1.3.7 Nukleolytische Spaltung von RNA

Es gibt viele Ribonukleasen, die RNA in Abhängigkeit von ihrer Sekundärstruktur schneiden. Aus dem Spaltungsmuster einer limitierten Spaltung mit diesen RNasen sollte daher eine Aussage über die Sekundärstruktur der zu untersuchenden RNA möglich sein. Die Enzymkonzentration und die Inkubationsdauer müssen dabei so gewählt werden, daß kein vollständiger Verdau der RNA auftritt. Etwa 50% der eingesetzten RNA sollte unverdaut bleiben, damit statistisch nur eine Spaltung pro Molekül auftritt.

Vor der enzymatischen Spaltung wurde die RNA wie auch während der Selektion für 5 min bei 90°C in Bindungspuffer denaturiert und anschließend in 20 min auf RT abgekühlt. Die Spaltungsreaktionen wurden in einem Volumen von 6 µl in silikonisierten Eppendorfgefäßen durchgeführt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 6 µl Probenpuffer gestoppt und die Proben auf Eis gestellt. 54 des Reaktionsansatzes werden auf einem 25%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Spaltung mit Ribonuklease T₁

Ribonuklease T₁ (aus *Aspergillus oryzae*) spaltet spezifisch einzelsträngige RNA auf der 3'-Seite von Guanosinnukleotiden (Gp ↓ Np). Diese Nuklease ist in der Lage unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) zu spalten. Die Spaltung unter denaturierenden Bedingungen ermöglicht eine spätere Zuordnung der Basen auf dem Autoradiogramm, während man aus der nativen Spaltung Aufschluß über einzelsträngige Regionen erhalten kann.

denaturierende Spaltung

2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
1 µl t-RNA (6 µg/µl)
2 µl T₁-Spaltungspuffer
0,4 µl H₂O

native Spaltung

2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
3 µl t-RNA (6 µg/µl)
0,7 µl H₂O
0,3 µl RNase T₁

denaturierende Spaltung
0,6 µl RNase T₁
20 min/55°C

native Spaltung
20 min/Raumtemperatur

5 Spaltung mit Ribonuklease T₂

Ribonuklease T₂ (aus *Aspergillus oryzae*) spaltet sequenzunabhängig einzelsträngige RNA unter Freisetzung von Oligonukleotiden mit 3'-Phosphatgruppen. RNase T₂ kann daher in Kombination mit RNase S₁ für die Identifizierung nicht basengepaarter Bereiche eingesetzt werden.

- 10 native Spaltung:
2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
3 µl t-RNA (6 µg/µl)
0,7 µl H₂O
15 0,3 µl RNase T₂ (5,75 U/µl)
20 min/Raumtemperatur

Spaltung mit Ribonuklease S₁

- 20 Die Nuklease S₁ (aus *Aspergillus oryzae*) spaltet wie die RNase T₂ sequenzunabhängig einzelsträngige Bereiche der RNA. Im Gegensatz zur RNase T₂ werden hier jedoch Oligonukleotid-5'-phosphate freigesetzt.

- native Spaltung:
2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
25 3 µl t-RNA (6 µg/µl)
0,7 µl H₂O
0,3 µl RNase S₁ (0,4 U/µl)
20 min/Raumtemperatur

30 Spaltung mit Ribonuklease V₁

Mit der Ribonuklease V₁ (Cobra Venom) lassen sich bevorzugt doppelsträngige Bereiche der RNA sequenzunabhängig spalten. Wie bei der Spaltung mit RNase S₁ werden auch hier Oligonukleotid-5'-phosphate freigesetzt.

- 35 native Spaltung:
2 µl RNA (ca. 150000 cpm)
3 µl t-RNA (6 µg/µl)
0,6 µl H₂O
0,4 µl RNase V₁ (0,72 U/µl)
40 20 min/Raumtemperatur

1.3.8 Partielle alkalische Hydrolyse von RNA

- 45 Unter alkalischen Bedingungen ist RNA im Gegensatz zur DNA instabil. Über einen zyklischen 2',3'-Phosphat-Übergangszustand entstehen Spaltprodukte mit einer 5'-Hydroxylgruppe. Durch eine zeitliche Begrenzung der alkalischen Hydrolyse kann man die RNA so spalten, daß Oligoribonukleotide jeder möglichen Länge entstehen. Trägt man dieses Reaktionsgemisch auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel auf so erhält man nach der Autoradiographie eine Alkalileiter, die für die Zuordnung der Spaltprodukte der enzymatischen RNA-Spaltung verwendet werden kann. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl Probenpuffer gestoppt und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gestellt.

- 50 Reaktionsansatz:
3 µl RNA (ca. 150000 cpm)
1,5 µl t-RNA (6 µg/µl)
4,5 µl Alkali-Puffer (50 mM NaOH, 1 mM EDTA, frisch angesetzt)
55 45–60 sec/120°C

1.4 Vorbereitung der Affinitätschromatographie

1.4.1 Immobilisierung der Peptide auf Sepharose

- 60 Für die affinitätschromatographische Selektion müssen die Peptide auf einem Trägermaterial immobilisiert werden. Die Immobilisierung soll reversibel sein, um eine Elution der spezifisch bindenden RNA als RNA-Peptid-Komplex zu ermöglichen. Daher sollen Peptide über Disulfidbrücken an Thiopropyl-Sepharose 6B gekoppelt werden. Um das zu ermöglichen, müssen die Peptide eine freie Thiolgruppe besitzen, weshalb das βA4(1–40) und βA4(1–16) mit einem Cystein am N-terminalen Ende synthetisiert wurden und folglich bzw. 17 Aminosäuren enthalten.

65 Zum Quellen suspendiert man 1,4 g Thiopropyl-Sepharose 6B in 30 ml Wasser und schwenkt für 15 min. Alle verwendeten Lösungen sollten vor der Benutzung durch 10 min. Ultraschallbehandlung entgast werden, um eine Oxidation der Sulfidgruppen durch Luftsauerstoff zu vermeiden. Man filtriert ab und wäscht mit 3 × 50 ml Wasser. Das gequollene

Gel wird in 25 ml einer Lösung aus 88 μM βA4 (1–16), 12 μM Tris, pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA suspendiert und für 1,5 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Bei der Immobilisierung des βA4 (1–40) muß aufgrund der großen Tendenz zur Aggregation und der damit verbundenen Unlöslichkeit die Immobilisierung in einer 60%igen Hexafluorisopropanollösung (LTFIP) durchgeführt werden. Dazu suspendiert man das in 25 ml einer Lösung aus 45 μM βA4 (1–40), 10 mM Tris-HCl, pH 7,7 und schwenkt für 1,5 h bei RT.

Man filtriert das Gel ab und wäscht mit 2×50 ml einer 0,1 M Natriumacetatlösung, pH 6,0. Um von nicht reagierten Thiolgruppen des Gels die Schutzgruppen abzuspalten und reaktiven Thiolgruppen zu blockieren, wurde das Gel für 45 min unter Schwenken in 20 ml 2-Mercaptoethanol (5 mM, 0,1 M NaOAc, pH 6) suspendiert. Das Säulenmaterial wird zweimal mit 50 ml Bindungspuffer gewaschen und bei 4°C unter Bindungspuffer aufbewahrt.

Für die Vorsäule wurde das Säulenmaterial wie oben beschrieben behandelt, jedoch ohne die Zugabe des Peptids. Hier wurden alle Thiopyridylgruppen durch 2-Mercaptoethanol substituiert.

1.4.2 Bestimmung der Peptidkonzentration auf dem Säulenmaterial

Zur Bestimmung der Beladung des Säulenmaterials wurde das Peptid von 100 μl Säulenmaterial durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken abgespalten. Dazu eluiert man das Peptid von der Säule, indem man zweimal 500 μl Elutionspuffer langsam durch die Säule fließen läßt (30 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Konzentration des Peptids im Eluat wurde auf zwei Arten bestimmt.

Protein-Assay

Die Konzentration des Peptids im Eluat konnte beim βA4 (1–16) durch den Coomassie-Protein-Assay bestimmt werden. Dazu gibt man 500 μl des Eluats mit 500 μl Coomassielösung (Pierce) zusammen, schüttelt und mißt die Absorption in einer 1 ml Einwegküvette bei 595 nm. Die Konzentration erhält man bei Vergleich mit einer Eichkurve, die bei verschiedenen bekannten Konzentrationen aufgenommen wurde. Da die Absorption nicht zeitlich konstant ist, ist es wichtig, daß die Messung immer nach der gleichen Zeit nach der Zugabe der Coomassielösung durchgeführt wird. Aufgrund der Aggregation in wäßrigen Lösungen, konnte die Peptidkonzentration des βA4 (1–40) nicht durch den Proteinassay bestimmt werden und wurde deshalb durch Aminosäureanalyse ermittelt.

Aminosäureanalyse

200 μl des Eluats (1 ml) wurden in einem Dansylgläschen zur Trockne eingengt und durch Gasphasenhydrolyse sauer hydrolysiert. Dazu stellt man das Dansylgläschen in ein 40 ml Gefäß mit Schraubverschluß und Hahn zu etwa 3 ml 5,7 M Salzsäure. Durch Evakuieren des Gefäßes und Erhitzen auf 150°C für 1 h wird die Probe hydrolysiert. Man engt die Probe im Vakuum ein und nimmt sie in 100 μl Wasser auf. 20 μl dieser Lösung wurden für die Aminosäureanalyse nach den Kopplungsschritten des Edman-Abbaus mit Phenylisothiocyanat derivatisiert. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte durch HPLC auf einer ABT PTH RP C18 Säule (5 μm , 220 \times 2,1 mm) mit einem binären Gradientensystem (Puffer A: H_2O , Puffer B: 5% w/v Tetrahydrofuran, 6 mM Natriumacetat, pH 4,2). Die Stoffmengen der Aminosäuren des Peptids wurden durch Vergleich der Peakhöhe der Aminosäuren mit einer Referenzsubstanz bekannter Konzentration berechnet. Nach Division der Stoffmenge durch die Anzahl der Reste im Peptid und Mittelung über 10 Aminosäuren erhält man die Konzentration des Peptids im Eluat und damit die Beladung des Säulenmaterials. Die Aminosäureanalyse wurde von Dr. Schröder durchgeführt.

1.4.3 Silikonisierung der Säulen

Um die Adsorption der RNA an der Oberfläche der Säulen bzw. der Fritten möglichst gering zu halten, wurden diese vor der Benutzung silanisiert. Dazu spült man die Säulen mit Toluol und füllt sie anschließend mit einer 5%igen Lösung aus Dichlordimethylsilan in Toluol. Nach ein bis zwei Stunden wird diese Lösung entfernt, die Säulen mit Toluol und anschließend mit Wasser mehrmals gründlich gewaschen.

1.4.4 Optimierung des Bindungspuffers

Um nichtspezifische Wechselwirkungen der RNA zu unterdrücken, wurden die Salzkonzentrationen im Bindungspuffer auf das Säulenmaterial abgestimmt. Dazu wurde die NaCl-Konzentration zwischen 150–500 mM und die MgCl_2 -Konzentration im Bereich von 5–50 mM variiert. Die Bedingungen, unter denen am wenigsten RNA auf der Säule gebunden wurde, sollten für die Selektion verwendet werden.

1.4.5 Durchführung der in vitro-Selektion

Die Selektion der hochaffinen RNA-Moleküle wurde affinitätschromatographisch auf kleinen Säulen (Mobicols, Mo Bi Tec) mit 100 μl Säulenvolumen durchgeführt. In jeder Selektionsrunde wurde eine Vorsäule (ohne Peptid) und eine Hauptsäule (Affinitätssäule) verwendet. Die radioaktiv markierte RNA wurde in Bindungspuffer auf eine Konzentration von 2,5 μM eingestellt. Damit die RNA in ihrer stabilen Konformation vorliegt, denaturiert man für 5 min bei 90°C und renaturiert durch 20 minütiges Abkühlen auf Raumtemperatur. 200 μl dieser RNA trägt man auf die Vorsäule auf. Lediglich in der ersten Selektionsrunde wurde aufgrund der großen RNA-Menge von diesem Protokoll abgewichen und bei einer doppelt so großen Konzentration ca. 2,5 nmol RNA eingesetzt. Das Säulenvolumen der Hauptsäule wurde auf 250 μl vergrößert. Die Vor- und Hauptsäule wurde in der ersten Runde mit 3 ml Bindungspuffer gewaschen, während sie in allen folgenden Runden nur noch mit 2 ml Puffer gewaschen wurde. Im Anschluß wurde das Peptid mit der bindenden RNA

nach Entfernung der Vorsäule mit 1 ml Elutionspuffer von der Säule in ein silikonisiertes Eppendorfgefäß eluiert.

Um einen möglichst konstanten Fluß durch die Säule zu erhalten, wurde eine Peristaltikpumpe eingesetzt. Der Bindungspuffer wurde in 500 µl Portionen auf die Säule gegeben und gelangt durch Anlegen eines leichten Überdrucks mit Hilfe der Pumpe durch die Vorsäule auf die Hauptsäule. Nun wird die Pumpe erst an die Hauptsäule angeschlossen, bevor die nächste Portion Puffer auf die Vorsäule aufgetragen werden kann. Der Fluß durch die Säulen soll etwa 33–35 µl/min betragen.

Nach beendeter Elution wird die RNA-Konzentration der Wasch- und Elutionslösung sowie der Säulen durch Cerenkov-Zählung bestimmt. Das Eluat wird in einer Vakuumzentrifuge auf ca. 400 µl eingengt und zur Entfernung des Peptids mit Phenol und Chloroform extrahiert. Mit Ethanol unter Zusatz von Glycogen (40 µg) wird die RNA gefällt und anschließend revers transkribiert. Die DNA wird durch PCR amplifiziert und für die nächste Selektionsrunde durch Transkription in RNA umgeschrieben. Wenn kein weiterer Anstieg der spezifisch eluierten RNA mehr beobachtet wird, kann die Selektion abgebrochen werden. Um das Gemisch der unterschiedlichen Sequenzen analysieren zu können, separiert man die Sequenzen durch Klonierung in Bakterienzellen.

1.4.6 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die affinitätschromatographische Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden mit Hilfe von Econo-Säulen (Bio-Rad) durchgeführt, da diese ein größeres Volumen besitzen, als die während der Selektion verwendeten Mobicols. Ein genügend großes Säulenbettvolumen ist entscheidend, damit die aufgetragene Menge RNA (10 µl, 100 nM) als scharfe Bande durch die Säule wandern kann. Es wurde mit 800 µl Säulenmaterial gearbeitet, wodurch sich ein Säulenvolumen von 810 µl ergibt (Volumen des Hahns etc.). Nach Auftragen der radioaktiv markierten RNA wäscht man die Säule solange mit Bindungspuffer, bis keine Radioaktivität mehr auf der Säule detektiert werden kann. Anfangs fängt man das Eluat tropfenweise auf um das Totvolumen möglichst genau bestimmen zu können. Später genügen 500 µl Fraktionen. Durch Einsatz einer Pumpe und eines Fraktionssammlers kann die Bestimmung automatisiert werden.

1.5 Mikrobiologische Methoden

Für die Transformation von Epicurian Coli Zellen muß die DNA in einen Vektor ligiert werden. Verwendet wurde hier der pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector (Stratagene), ein Abkömmling des pBluescript II SK(+) phagemids, der ein Gen für Ampicillinresistenz sowie einen lac Promotor und einen T7-RNA Polymerase Promotor enthält. Innerhalb des SK multiple cloning sites befindet sich eine seltene Srf I-Schnittstelle (5'-GCCC/GGGC-3'), die eine Ligation der blunt-ended PCR-Produkte der Selektion mit dem geschnittenen Vektor ermöglicht. Da für die PCR standardmäßig die Pfu DNA Polymerase verwendet wurde, ist eine Aufarbeitung der DNA nicht nötig. Anders wäre das bei Verwendung von Taq Polymerase, da diese häufig eine weitere Base an das Kettenende hängt. Die Restriktionsspaltung des Vektors, sowie die Ligation des DNA-Inserts können gleichzeitig in einem Gefäß durchgeführt werden. Durch die gleichzeitige Aktivität des Restriktionsenzym und der Ligase liegt ein Gleichgewicht zwischen geschnittenem und ungeschnittenem Vektor vor, bis durch Ligation des Inserts die Srf I Restriktionsschnittstelle verloren geht, und der Vektor nicht mehr gespalten werden kann.

Diese Plasmide werden nun in superkompetente Epicurian Coli Zellen XLI-Blue MRF⁺ Kan (Stratagene) eingeführt und auf Agarplatten ausgestrichen, die X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid), IPTG (Isopropylthio-β-D-galactosid) sowie das Antibiotikum Ampicillin enthalten. Aufgrund des Antibiotikums können nur die Zellen auf dem Medium wachsen, die durch Aufnahme eines Plasmids eine Ampicillinresistenz besitzen. Die Zellen, die ein nicht rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, besitzen ein intaktes Gen für die β-Galactosidase, die durch Spaltung des X-Gals einen blauen Farbstoff freisetzt. Diese Zellen färben sich blau. Die weißen Kolonien stellen die transformierten Bakterien dar, die genau ein rekombinantes Plasmid enthalten, das beliebig vermehrt werden kann.

1.5.1 Ligation

Vor der Ligation wird die DNA unter Zugabe des gleichen Volumens einer 4 M Ammoniumacetatlösung (anstelle des Natriumacetats) und des 2,5fachen Volumens an Ethanol gefällt. Das Pellet wird in TE-Puffer aufgenommen.

Das Verhältnis von Insert. Plasmid soll zwischen 40 : 1 und 100 : 1 liegen. Es wurde ein Verhältnis von 70 : 1 gewählt, was einer Menge von 364 fmol Insert pro Standardansatz entspricht.

Ligationsansatz:

1 µl pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector (10 ng/µl)
1 µl 10 × PCR-Script-Puffer
0,5 µl ATP (10 mM)
3 µl PCR Produkt (364 fmol)
1 µl SrfI Restriktionsenzym (5 U/µl)
1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl)
ad 10 µl mit H₂O auffüllen

Man läßt eine Stunde bei RT reagieren, erhitzt für 10 min auf 65°C und stellt die Probe bis zur Transformation auf Eis.

1.5.2 Transformation

Durch eine spezielle Salzbehandlung ist es möglich, Zellmembranen DNA-permeabel (kompetent) zu machen und zu einer Aufnahme eines Plasmids zu bringen. Für die Transformation wurden jedoch käuflich erhältliche kompetente Zel-

len verwendet. Diese sind schon gegenüber kleinen Temperaturschwankungen sehr empfindlich und müssen deshalb immer bei -80°C gelagert werden bzw. während des Aliquotierens permanent auf Eis stehen.

Weiterhin ist es wichtig, die Dauer des 45 s Temperaturintervalls genau einzuhalten. Etwa $\frac{1}{2}$ h vor dem Ausstreichen der Zellen sollten die ampicillinhaltigen Agarplatten (100 $\mu\text{g/ml}$) mit 20 μl IPTG (0,2 M) und 20 μl X-Gal (10% (w/v) in DMF) überschichtet werden. Man bereitet je Transformationsansatz drei Agarplatten vor, trägt jeweils 100, 150, bzw. 200 μl Ansatz auf und verstreicht ihn mit einem gebogenen Glasstab auf der Agaroberfläche. Die Agarplatten läßt man etwa 18 h im Brutschrank bei 37°C inkubieren.

Transformationsansatz:

40 μl Epicurian Coli XL1-Blue MRF Kan supercompetente Zellen

0,7 μl b-Mercaptoethanol (1,5 M)

10 min auf Eis inkubieren, alle 2 min schütteln

2 μl Ligationsansatz

30 min auf Eis inkubieren

45 sec/ 42°C , direkt anschließend auf Eis

450 μl SOC-Medium (vorgewärmt auf 42°C)

$37^{\circ}\text{C}/1$ h schütteln

auf Agarplatten mit X-Gal, IPTG und Ampicillin ausstreichen, $37^{\circ}\text{C}/18$ h inkubieren.

1.5.3 Isolierung der Plasmide

Die nach der Transformation auf der Agarplatte erhaltenen weißen Klone werden mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens (Zahnstocher) gepickt und in 3 ml Übernachtskultur bei 37°C im Schüttelwasserbad vermehrt. Von jeder Kultur wird eine Glycerinkultur für eine eventuelle spätere Verwendung aufbewahrt. Dazu homogenisiert man 0,5 ml einer Kultur mit dem gleichen Volumen Glycerin, friert die Probe in flüssigem Stickstoff ein und lagert sie bei -80°C . Die restlichen 2,5 ml werden in zwei Portionen in ein Eppendorfgefäß überführt und die Zellen bei 13000 Upm, 2 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 500 μl STE-Puffer unter Schütteln suspendiert. Man pelletiert erneut und suspendiert anschließend für 10 min in 100 μl Lysatlösung I. Man gibt 200 μl Lysatlösung II zu und schwenkt die Proben vorsichtig während der 20 minütigen Inkubation auf Eis. In diesem Schritt erfolgt die Lysis der Zellen. Durch Zugabe von 150 μl Lysatlösung III wird die chromosomale DNA bei $0^{\circ}\text{C}/15$ min gefällt. Dabei dürfen die Proben nur vorsichtig gemischt werden (nicht vortexen), um ein Zerreißen der DNA durch die Scherkräfte zu vermeiden. Die Zelltrümmer und die chromosomale DNA werden bei 13000 Upm/15 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Man extrahiert mit Phenol (pH 4,5–5) und Chloroform, fällt mit Ethanol und löst das Pellet in 50 μl TE-Puffer. Da in diesen Proben die mRNA der Zelle noch enthalten ist, diese das Ergebnis der Sequenzierung auf einem ABI-Sequencer jedoch stört, muß noch ein RNA-Verdau durch Zugabe von 250 μl ST-Puffer aus dem Plasmid-Isolierungskit (siehe unten) durchgeführt werden. Man fällt erneut mit Ethanol und löst die Probe in 50 μl Wasser.

Alternativ zu dieser Isolierung wurde auch ein Kit (Nucleobond AX20, Macherey-Nagel) verwendet. Hierbei wurde entsprechend der Vorschrift vorgegangen.

Die Reinheit und die Größe der Plasmide wurden gelelektrophoretisch auf einem 1%igem Agarosegel überprüft (siehe 1.2.1).

1.6 Charakterisierung der Aptamere

Die Primärstrukturen der Aptamere wurden mit Hilfe eines Computerprogramms auf homologe Bereiche untersucht. Dazu wurde ein Programm in Pascal geschrieben, das die Sequenzen als Textdatei einliest und auf Motive variabler Länge hin vergleicht. Es werden alle Motive, die mehrmals auftreten, mit der Nummer der Sequenzen, in denen sie vorgefunden wurden, in einer Textdatei ausgegeben. Diese Datei kann mit einem Textverarbeitungsprogramm bearbeitet oder ausgedruckt werden.

2 Ergebnisse

Die große Bedeutung des Amyloids im Verlauf der Alzheimerschen Krankheit ist unbestritten, obwohl die Ursachen der Krankheit immer noch unbekannt sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Ablagerungen dieses Peptids in den Gehirnen der Patienten neurotoxisch wirken. Durch Einsatz der PNA-Technologien wurden mit Hilfe der in vitro-Selektion hochaffine RNA-Moleküle gegen das Amyloid und ein Amyloidfragment. Diese Aptamere können beispielsweise als Hilfsmittel zur weiteren Erforschung der Krankheit dienen, können aber auch Hilfsmittel für die Diagnose von Alzheimer sein. Es existieren Studien, die besagen, daß der Amyloidgehalt im Blut von Alzheimer-Patienten sich von dem gesunder Menschen unterscheidet (Li et al., 1995, Rosenberg et al., 1997, Di Luca et al., 1998). Dies zeigt, daß für diese weitverbreitete Krankheit mit der Erfindung eine Diagnose und wirkungsvolle Medikamente eröffnet werden.

Aptamere besitzen ähnliche Eigenschaften wie Antikörper, haben den Antikörpern gegenüber aber einige Vorteile. Sie sind kleiner und können durch chemische Synthese in hoher Reinheit produziert werden. Die chemische Synthese erlaubt auch eine gezielte Modifizierung bzw. den Einbau von Reportermolekülen, was für einen Einsatz in der Forschung und Diagnose von großem Interesse ist.

In den Amyloid-Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten findet man das Amyloid in der unlöslichen β -Faltblattstruktur vor. Der Übergang von der löslichen α -Helix- bzw. Knäuelform in die β -Faltblattstruktur verläuft in wäßriger Lösung relativ schnell und ist abhängig von einigen Parametern, wie z. B. der Salzkonzentration und dem pH-Wert. Es konnte gezeigt werden, daß die Änderung der Konformation von den unpolaren Aminosäuren am C-terminalen Ende

des Amyloids ausgeht. Durch Verkürzen des Amyloids kann man daher Peptide erzeugen, die sich wesentlich langsamer bzw. fast gar nicht in die unlösliche β -Faltblattstruktur umwandeln. Da diese verkürzten Peptide deutlich einfacher zu handhaben und zudem auch noch kostengünstiger sind, sind in den Ausführungsbeispielen auch Aptamere gegen ein Fragment des Amyloids vorgestellt. Da nicht gewährleistet ist, daß das Aptamer gegen das Fragment auch das Amyloid erkennt, ist aber auch gegen das komplette β A4 selektiert worden. Es wäre denkbar, daß man auf diese Weise auch Aptamere gegen die lösliche und unlösliche Konformation gewinnen könnte. Die beiden Peptide wurden chemisch synthetisiert und von Schering AG zur Verfügung gestellt.

Cys- β A4(1-16):

NH₂-Cys-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-COOH

10 Cys- β A4(1-40):

NH₂-Cys-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-COOH

2.1 Immobilisierung der Peptide

15

Für die Selektion durch Affinitätschromatographie wurden die beiden Peptide reversibel auf einer Matrix immobilisiert. Dazu wurden die Peptide mit einem Cystein am N-terminalen Ende synthetisiert, um eine Immobilisierung auf Thiopropyl-Sepharose 6B (Pharmacia) über Disulfidbrücken zu ermöglichen. Die freie Thiolgruppe des Peptids substituiert die Pyridylgruppe, die durch Umwandlung in das stabile 2-Thiopyridon eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt. Durch Waschen mit Dithiothreitol (DTT) kann die Disulfidbrücke reaktiv gespalten werden und das Peptid wieder von der Matrix eluiert werden. Da das bei der Immobilisierung freigesetzte 2-Thiopyridon bei 343 nm absorbiert, sollte eine Bestimmung der Konzentration des Peptids auf dem Säulenmaterial durch photometrische Konzentrationsbestimmung des freigesetzten Thiopyridons möglich sein. Diese Methode führte jedoch zu hohen, nicht reproduzierbaren Werten. Daher wurde das Peptid von 100 μ l Säulenmaterial mit DTT eluiert und die Konzentration im Eluat mit Hilfe des Coomassie Proteinassays bestimmt. Da der Assay nicht linear ist, mußte zuvor eine Standardkurve mit verschiedenen Peptidkonzentrationen aufgenommen werden. Durch Messung der Absorption bei 595 nm und Vergleich mit der Standardkurve wurde beim β A4(T-16) eine Beladung von 46 μ M ermittelt.

20

25

Aufgrund der hohen Tendenz zur Aggregation konnte dieser Assay beim β A4(1-40) nicht verwendet werden. Deshalb wurde die Konzentration des Peptids im Eluat durch Aminosäureanalyse bestimmt. Dazu wurde das Eluat hydrolysiert und auf einen Proteinsequencer aufgetragen. Durch Mittelung der Peakflächen der einzelnen Aminosäuren und Vergleich mit einer Probe bekannter Konzentration konnte die Konzentration auch beim β A4(1-40) bestimmt werden. Die Beladung des Säulenmaterial mit β A4(1-16) lag bei dieser Bestimmung bei 40 μ M, während sie beim β A4(1-40) 4 μ M entsprach.

30

35

2.2 In vitro-Selektion

Erstellung der RNA-Bibliothek

Die RNA-Bibliothek entsteht durch in vitro-Transkription aus einer DNA-Bibliothek, die chemisch an einer Festphase synthetisiert wurde. Sie wurde mit Hilfe einer Synthesemaschine als einzelsträngige DNA, bestehend aus zwei Primern aus jeweils 20 Nukleotiden und einer 70 Nukleotide langen randomisierten Region, erstellt. Für die Synthese von 3' in 5' Richtung wurde die übliche Phosphoramiditchemie verwendet. Den zufälligen Einbau der vier Nukleotide erreicht man durch Verwendung einer Lösung aus allen vier DNA-Phosphoramiditen, wobei die unterschiedliche Reaktivität im Mischungsverhältnis berücksichtigt wurde (dA : dG : dC : dT = 3 : 2, 5 : 2, 5 : 2). Bei einem randomisierten Bereich aus 70 Nukleotiden sind theoretisch 4^{70} oder $1,4 \cdot 10^{42}$ verschiedene Moleküle denkbar. Dies entspricht allerdings $2,3 \cdot 10^{18}$ mol oder $8,2 \cdot 10^{19}$ kg. Dagegen ist die tatsächlich synthetisierte Menge von ca. 10^{15} Molekülen so gering, daß es statistisch sehr unwahrscheinlich ist, daß zwei gleiche Moleküle synthetisiert wurden. Die Ausbeute jeder einzelnen Kopplung der Synthese lag über 99% und konnte durch die Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe verfolgt werden. Jedoch lag die Gesamtausbeute aufgrund der vielen Kopplungen und der großen Verluste bei der Aufreinigung über ein Polyacrylamidgel lediglich bei knapp 2% oder 3,8 nmol. Von dieser DNA müssen die Moleküle abgezogen werden, die aufgrund von Fehlern bei der Synthese (z. B. keine vollständige Abspaltung der Schutzgruppe, Abspaltung der Basen etc.) nicht durch PCR amplifizierbar sind. Dazu wurde eine Probe dieser DNA in einem PCR-Zyklus mit radioaktiv markierten Desoxynukleotid umgesetzt und die Menge an produzierten Gegenstrang quantifiziert. Der Anteil an durch PCR amplifizierbarer DNA lag bei 42% oder 1,6 nmol. Daraus ergibt sich eine Komplexität von ca. $1 \cdot 10^{15}$ Molekülen.

45

50

55

Die einzelsträngige DNA-Bibliothek wurde durch PCR zum Doppelstrang komplettiert und vervielfältigt. Dabei wurde zusätzlich durch Verwendung eines verlängerten Primers die 17 Nukleotide lange T7-Promotorsequenz eingefügt, die für eine Transkription in RNA benötigt wurde. Bei dieser PCR-Reaktion lag das Ziel in einer kleinen Vermehrung einer sehr großen DNA-Menge. Der DNA-Pool wurde um den Faktor 13 vervielfältigt.

60

Durchführung der Selektion

Die Selektion für das β A4(1-16) und das β A4(1-40) wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Der verwendete Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 750 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) wurde so an die Selektionsbedingungen angepaßt, daß in einer Testselektion die unspezifischen Wechselwirkungen auf der Selektionssäule minimiert wurden. Die Selektion wurde in Kunststoffsäulen mit einer kleinen Fritte am unteren Ende und einer großen Fritte über dem Säulenmaterial durchgeführt. Die Säule sowie die Fritten wurden vor der Selektion silikonisiert, um eine Adsorption der RNA so gering wie möglich zu halten. Weiterhin wurde nach der Ethanol-fällung der RNA im Anschluß an die T7-Transkription nur noch mit silikonisierten Eppendorfgefäßen gearbeitet. In jeder Selektionsrunde wurde mit einer

65

Vorsäule mit Säulenmaterial ohne Peptid gearbeitet, um RNA-Moleküle abzutrennen, die spezifisch an das Säulenmaterial binden. Da die RNA-Menge, die in der ersten Runde auf die Säule aufgetragen wurde, um ein Vielfaches größer war als in den folgenden Runden, wurde das Säulenvolumen der Hauptsäule auf 250 µl vergrößert, während das Volumen der Vorsäule in allen folgenden Runden konstant bei 100 µl gehalten wurde. In der ersten Runde wurden 2,3 nmol des hybridisierten RNA-Pools, entsprechend durchschnittlich 1,4 Kopien pro Sequenz, mit einer Konzentration von 5 µM auf die Säule aufgetragen und mit 3 ml Bindungspuffer gewaschen. Durch anschließendes Waschen mit 1 ml Elutionspuffer wurden die Disulfidbrücken gespalten und das Peptid mit der spezifisch bindenden RNA eluiert. Das Peptid wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion abgetrennt, die RNA mit Ethanol gefällt und in cDNA revers transkribiert, durch PCR amplifiziert und für die nächste Runde in RNA transkribiert. In der ersten Runde konnte die Komplexität des Pools bereits so weit herab gesetzt werden, daß in allen weiteren Runden nur noch 500 µmol renaturierte RNA mit einer Konzentration von 2,5 pH auf die Säule aufgetragen wurden. Außerdem wurde das Säulenbettvolumen der Hauptsäule auf 100 µl verringert und nur noch mit 2 ml Bindungspuffer gewaschen. Bei beiden Selektionen wurde ein Anstieg der spezifisch eluierten RNA in der 4. Runde beobachtet. Nach der 8. Runde konnte die Selektion abgebrochen werden, da kein weiterer Anstieg der spezifisch eluierten RNA beobachtet werden konnte (Tab. 1). Auffällig ist, daß der Anteil der auf der Vorsäule bindenden RNAs von Runde zu Runde zunimmt, obwohl in jeder Runde eine Vorsäule verwendet wurde (Tabelle 1). Ebenfalls ansteigend ist der Anteil der RNA, der nicht von der Vor- und Hauptsäule eluiert werden kann.

2.3 Charakterisierung der Aptamere

Die Eluate nach der achten Selektionsrunde wurden revers transkribiert und durch PCR amplifiziert. Man erhält so ein Gemisch aus Aptamersequenzen, die für eine Analyse separiert werden müssen. Durch Klonierung in kompetenten Bakterienzellen, die genau ein DNA Plasmid aufzunehmen vermögen, und anschließendes Ausstreichen auf einer Agarplatte erhält man einzelne Kolonien, die eine Aptamersequenz enthalten. Für die Transformation wurde die DNA in den pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector (Stratagene) ligiert. Dieser Vektor enthält ein Gen für Ampicillinresistenz sowie einen lac Promotor. Nach Transformation des Vektors in Epicurian Coli XLT-Blue MRF⁺ Kan Zellen wurden die Zellen auf Agarplatten mit X-Gal, IPTG und dem Antibiotikum Ampicillin ausgestrichen. Aufgrund des Ampicillins können nur transformierte Zellen wachsen, wobei sich jene mit einem Vektor ohne Insert aufgrund des X-Gals und des intakten β -Galactosidase-Gens blau färben. Es wurden zu jeder Selektion etwa 100 weiße Klone ausgewählt und die Plasmide isoliert. Sequenziert wurden die Inserts nach der Didesoxymethode von Sanger et al (Sanger et al., 1977), wobei ein Teil radioaktiv mit ³⁵S und ein Teil unter Verwendung eines ABI-Sequencers sequenziert wurde. Durch Verwendung des Universalprimers und des reversen Primers wurden beide Stränge des Inserts sequenziert. Insgesamt wurden für das β A4(T-40) und das β A4(1-16) jeweils 75 Proben sequenziert.

2.3.1 Sequenzanalyse

Primärstruktur

Die Primärstrukturen des randomisierten Bereichs der Aptamere, bestehend aus etwa 70 Nukleotiden, wurden auf homologe Bereiche untersucht. Die Existenz von konservierten Bereichen kann Aufschluß geben, welche Nukleotide an einer Bindung an das Zielmolekül beteiligt sind. Es wurde ein Computerprogramm geschrieben, das die Suche nach gleichen Motiven unterschiedlicher Länge durchgeführt hat. Die 75 ermittelten Sequenzen der Selektion gegen das β A4(1-40) können in 5 Gruppen eingeteilt werden, die für sich in hohem Maße konserviert sind (Fig. 1). 13 der 75 Sequenzen können in keine der Gruppen eingeteilt werden und besitzen auch untereinander keine konservierten Regionen. In allen anderen Sequenzen ist das Motiv b1 mit bis zu 11 Basen vertreten (Tabelle 2). Drei weitere Motive, die in einem Großteil der Sequenzen auftreten, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

Motiv-Nr.	konserviertes Motiv	verschiedene Gruppen	Anzahl der Sequenzen	Seq. [%]
b1	CACCGUAAGGA	5	62	83
b2	CGGCUUGUUUCCCC	4	52	69
b3	AAGUGUA	3	33	44
b4	CAUG . . UC . UGCA	2	32	43

Wie bei den Sequenzen für das β A4(T-40) können auch die Sequenzen der Aptamere gegen das β A4(1-16) in Gruppen eingeteilt werden, die sehr stark konserviert sind (Fig. 2). Anders als bei den Sequenzen der β A4(1-40)-Selektion gibt es nur ein Motiv, das in mehr als zwei Gruppen auftritt. Das Motiv a1 mit 9 Basen tritt jedoch in über der Hälfte der Sequenzen auf (Tabelle 3). Es wurden fünf weitere Motive aus 6 bis 11 Basen gefunden.

Tabelle 3

	Motiv-	konserviertes	verschiedene	Anzahl	Seq.
5	Nr.	Motiv	Gruppen	Sequenzen	[%]
	a1	UGAGGCCCC	2	37	51
	a2	CGCAUG	3	32	44
10	a3	CCCGAG	2	29	40
	a4	AAGUACCGUAA	2	25	35
	a5	CUUCCG	2	25	35
15	a6	CAACAA	2	10	T4

Sekundärstruktur

Die Aptamere gegen das β A4(1–40) wurden auch hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur analysiert, wobei die Sekundärstrukturmodelle mit Hilfe des Computerprogramms RNADraw berechnet wurden (Matzura & Wennborg, 1996). Erwartungsgemäß zeigte sich, daß innerhalb einer Familie die Strukturen der Aptamere ähnlich sind. In den Fig. 3–6 sind die Strukturen einiger Aptamere aus unterschiedlichen Familien dargestellt. Beim Vergleich der Strukturen fällt auf, daß das Motiv b2 (Tabelle 2) bei allen Aptameren mit dem Anfang des Primer A basengepaart auftritt. Da nicht alle Basen des Motivs komplementär zum Primer sind, tritt ebenfalls in jeder Struktur ein Loop auf. Dies läßt vermuten, daß diese Stem-Loop Region entscheidend für die Wechselwirkung mit dem Amyloid ist. Dabei besitzt der Stamm vermutlich nur eine stabilisierende Funktion, während eine Bindung an das Peptid über die ungepaarten Basen des Loops stattfinden könnte. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß bei allen Sequenzen immer vier Uridine bzw. drei Uridine und ein Cytidin diesen Loop bilden. Beim Aptamer β 61 in Fig. 3 sind dies die Basen U6, U7, U72 und U73. Obwohl zu einer anderen Gruppe gehörig, ähnelt das Aptamer β 124 dem β 61 sehr. Neben dem Primer-gepaarten Motiv und dem Loop findet man bei beiden auch noch einen Hairpin mit der Basenfolge AAG (Fig. 3, A50–G52, Fig. 4, A46–G48).

Während die Anordnung des Motivs b2 in allen Sequenzen ähnlich ist, sind die Gemeinsamkeiten beim Motiv b1 nicht so eindeutig zu erkennen. Zwar tritt bei der Sequenz des β 61 wie auch beim β 124 die ungepaarte Basenreihenfolge UAAG auf (Fig. 4, C32–G35), doch sind bei anderen Sequenzen diese Basen gepaart. Dennoch scheint dieses Motiv bei der Bindung des Peptids eine Rolle zu spielen, da ein Aptamer, β 19, gefunden wurde, in dem die Reihenfolge der Motive b1 und b2 vertauscht ist (Abb. 15). In der Nähe des 5'-Endes liegt das Motiv b2, das auch hier wieder mit dem Primer A basengepaart vorliegt, während das Motiv b1 nahe des 3'-Endes angeordnet ist. Eine strukturelle Ähnlichkeit dieses Bereichs mit den anderen Aptameren ist jedoch nicht ohne weiteres ersichtlich.

Das Aptamer β 55, mit der niedrigsten Dissoziationskonstante, unterscheidet sich etwas stärker von den Strukturen der anderen Aptamere, obwohl auch hier wieder die Motive b1 und b2 vorzufinden sind (Fig. 6). Im Gegensatz zu den anderen Strukturen sind hier weniger Basen mit dem Primer A gepaart. Auch der Loop aus den vier Pyrimidinen tritt in dieser Form nicht auf. Stattdessen existiert ein Loop aus den Basen AAU. In dem Motiv b1 liegen auch nur zwei Basen U-A (Fig. 6, U28, A29) einzelsträngig vor, was bedeuten könnte, daß diese beiden Basen an der Bindung des Peptids beteiligt sind. Auffällig ist, daß bei allen vier vorgestellten Strukturmodellen die letzten drei Basen des Primers in einen Hairpin hineinragen. Da diese Basen jedoch konserviert sind, muß es sich nicht um ein bedeutendes Strukturmerkmal handeln. Das Strukturmodell dieses Aptamers wurde durch enzymatische Spaltung mit RNasen genauer untersucht. Zu diesem Zweck wurde die RNA am 3- bzw. 5'-Ende radioaktiv markiert und unter Verwendung verschiedener spezifisch spaltender Nukleasen einer limitierten nukleolytischen Hydrolyse unterzogen. Verwendet wurden die Einzelstrang-spezifischen Nukleasen Ribonuklease T₂ und Nuklease S₁, die Doppelstrang-spezifische Ribonuklease V₁ sowie die Guanotin-spezifische Ribonuklease T₁. Der Vergleich der Strukturen legt die Vermutung nahe, daß das 3'-Ende der Aptamere bis zu den Basen des Motivs b2 nicht essentiell ist für die Bindung des Peptids.

2.3.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Bindung eines Aptamers an sein Target und damit die Bildung eines Komplexes kann als eine Gleichgewichtsreaktion betrachtet werden. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie wurden die apparenten Dissoziationskonstanten bestimmt. Bei dieser Methode macht man sich das Gleichgewicht zwischen freier und gebundener RNA zunutze, indem man durch Waschen mit Bindungspuffer die RNA von der Säule eluiert. Je stärker die RNA an das Peptid bindet, desto später wird die RNA von der Säule eluiert. Das Elutionsvolumen ist daher ein Maß für die Bindungskonstante in Abhängigkeit von der Säulengröße sowie der Beladung der Säule mit dem Peptid und läßt sich nach einer in folgender Literaturstelle angegebenen Gleichung berechnen (Famulok & Szostak, 1992, Sassanfar & Szostak, 1993). Damit diese Gleichung gültig ist, muß das Säulenvolumen im Verhältnis zum Volumen der autgetragenen RNA möglichst groß sein, damit wie bei einer säulenchromatographischen Aufreinigung die RNA in einer schmalen Bande durch die Säule läuft. Außerdem sollte die Konzentration der RNA-Lösung kleiner sein als die zu erwartende Bindungskonstante, um die Gleichung innerhalb ihres Gültigkeitsbereichs anzuwenden und so den Fehler der Dissoziationskonstante möglichst klein zu halten (Arnold et al., 1986). Daraus folgt, daß die RNA sehr stark radioaktiv markiert sein muß, damit selbst kleinste Mengen im fmol-Bereich noch detektiert werden können. Es wurde mit Mikrosäulen des Econo-Systems (Bio-Rad) gearbeitet, die sich durch einen geringen Querschnitt auszeichnen. 10 µl einer 100 nM RNA Lösung wurden auf eine Säule

mit einem Säulenbettvolumen von 800 µl aufgetragen und kontinuierlich mit Hilfe einer Pumpe eluiert. Das Elutionsprofil des Aptamers β55 wies einen scharfen Peak zu Beginn der Elution auf, welcher vermutlich auf fehlerhaft gefaltete RNA zurückzuführen ist, die nicht mit dem Peptid interagieren kann. Diesen Peak kann man zur Bestimmung des Totvolumens V_0 verwenden. Um das Totvolumen möglichst genau zu bestimmen, wurde zu Beginn der Elution ein sehr kleines Fraktionsvolumen gewählt, während später deutlich größere Fraktionen gesammelt wurden. Um die Aktivitäten der unterschiedlich großen Fraktionen vergleichen zu können, wurden die Daten auf ein konstantes Volumen von 100 µl normiert. 5

Um zu zeigen, daß es sich um eine spezifische Anreicherung von bindenden Aptameren handelt, wurde zum Vergleich ein Elutionsprofil des randomisierten RNA-Pools aufgenommen. Wie zu erwarten konnte hier keine Retardierung der RNA beobachtet werden. 10

Durch den Einsatz einer Vorsäule mit unbeladenem Trägermaterial in allen Selektionsrunden sollte eine Anreicherung von Säulenmaterial-affinen RNAs bereits verhindert worden sein. Um dennoch sicherzustellen, daß es sich bei den selektierten RNAs um Peptid-bindende Aptamere handelt, wurde ein Elutionsprofil der RNA auf einer Vorsäule aufgenommen. Da bei der Elution der RNA von der Vorsäule keine Retardierung beobachtet werden konnte, kann geschlossen werden, daß es sich um Aptamere gegen das Amyloid handelt. 15

Die Dissoziationskonstanten von vier Aptameren gegen das βA4(1-40) konnten auf diese Weise bestimmt werden (Tabelle 4). Da die verwendete RNA-Konzentration um den Faktor 5 größer ist als die beste Dissoziationskonstante, muß ein Fehler einkalkuliert werden, so daß die wirklichen Dissoziationskonstanten vermutlich geringfügig größer sind.

Obwohl die RNA vollständig von der Säule eluiert wurde, wurde das Säulenmaterial nach maximal drei Bestimmungen ausgewechselt, da keine Retardierung der RNA mehr festgestellt werden konnte. Dadurch wurde das Säulenmaterial zur limitierenden Größe, und es konnten nicht mehr Proben vermessen werden. 20

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Aptamere gegen das βA4(1-16) wurde analog durchgeführt. Hier konnte allerdings nur eine bindende Sequenz gefunden werden.

Tabelle 4 25

βA4 (1-40)		βA4 (1-16)	
Aptamer	app. K_d [nM]	Aptamer	app. K_d [nM]
β55	39		
β61	43	α4	758
β19	48		
β37	64		

5 <110> Schering Aktiengesellschaft

<120> Amyloidspezifisches Aptamer

10 <130>

15 <160> 70

20

<210> 1

<211> 70

25 <212> RNA

<213> künstliche Sequenz

30 <220>

<223> durch in der Beschreibung angegebenes

35 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 1

40 ACUUCGUCUU GCAGCGCGGC UUGUCUUCCC ACAUCCGUUC UAUCGGUAUG 50

ACUCUUUUUC CGUAAGGUCA 70

45

50

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210>	2		
<211>	68		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	2		
ACUUCGUCUU GCAGCGCGGC UUGUCUUCCC ACAUCCGUUC UAUCGGUAUG	50		20
ACUUUUUCCG UAAGGUCA	68		
			25
<210>	3		
<211>	66		
<212>	RNA		30
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			35
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	3		
UUUACCGUAA GGCCUGUCUU CGUUUGACAG CGGCUUGUUG ACCCUCACAC	50		45
UUUGUACCUC UGCCUG	66		
			50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 4
<211> 67
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 4
20 UUUACCGUAA GGCCUGUCUU CGUUUGACAG CGGCUUGUUG ACCCUCACAC 50
UUUGUACCUG CUGCCAA 67

25

<210> 5
30 <211> 67
<212> RNA
35 <213> künstliche Sequenz

<220>
40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
Selektionsverfahren gewonnen

45 <400> 5
UUUACCGUAA GGCCUGUCUU CGUUUGACAG CGGCUUGUUG ACCCUCACGC 50
50 UUUGUCCCAU GCCCGUC 67

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210>	6		
<211>	66		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	6		
UUUACCGUAA GGCCUGUCUU CGUUUGACAG CGGCUUGUUG ACCCACACAC	50		20
UUUGUCCCGG CUGCAG	66		
			25
<210>	7		
<211>	69		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	7		45
UUUACCGUAA GGCCUGUCUU CUUUUGACAG CGGCUUGUUG ACCCUCACGC	50		
UUUGUCCCG CUGUACCUG	69		50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 8
 <211> 67
 5 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz
 10
 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 15 Selektionsverfahren gewonnen
 <400> 8
 20 UUUACCGUAA GGCCUGUCAU CGUUUGACAG CGGCUUGUUG ACCCUUCCAC 50
 UAUGUGUGCC UGUAAUG 67
 25
 <210> 9
 30 <211> 69
 <212> RNA
 35 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen
 45 <400> 9
 UCCACCGUAA GAUUGUAAAC UAUCGCGUAA AGACGAAGUU UAUGUGGCCUU 50
 GUUUUCCCAC CGCCUUGCC 69
 50
 55
 60
 65

DE 199 16 417 A 1

<210>	10		
<211>	69		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	10		
UGUCCACCGU AAGAUUGUAA ACUAUCGUAA AGACGAAGUU UAUGUGGCUU	50		20
GUUUUCCCAC CGCCUUGCC	69		
			25
<210>	11		
<211>	69		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	11		45
UCCACCGUAA GAUUGUAAAC UAUCGCGUAA AGACGAAGUU UAUGUGGCUU	50		
GUUUUCCCACC ACCUUGCG	68		50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 12
<211> 68
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 12
20 UCCACCGUAA GAUUGUAAAC UAUCGCGUAA AAGACGAAGU UUAUGUGGCU 50
UGUUUUUCCCA CCGCCUUG 68

25

<210> 13
30 <211> 68
<212> RNA
35 <213> künstliche Sequenz

<220>
40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
Selektionsverfahren gewonnen

45 <400> 13
UCCACCGUAA GAUUGUAAAC UAUCGGGUAA AGACGAAGUU UAUGUGGCUU 50
GUUUUCCCACC GCCUUGCC 68
50

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210>	14	
<211>	65	
<212>	RNA	5
<213>	künstliche Sequenz	
<220>		10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen	15
<400>	14	
UGUCCACCGU AGAUUGUAAA CUAUCGCGUA AAGCGAAGUU UAUGUGGCUU	50	20
GUUUUCCCAG CCUUG	65	
		25
<210>	15	30
<211>	70	
<212>	RNA	35
<213>	künstliche Sequenz	
<220>		40
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen	45
<400>	15	
CUCGAUCACC GUAAGGACAU CUACGUAAGU GUAAUGC GGC UUGUUUCCC	50	50
CAUGCGUCUG CAUAUCUGUU	70	
		55
		60
		65

<210> 16
 <211> 69
 5 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz
 10
 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 15 Selektionsverfahren gewonnen
 <400> 16
 20 CUCGAUCACC GUAAGGACAU UUACGUAAGU GUA AUGCGGC UUGUUUCCC 50
 CAUGCGUCUG CAUAUCUGU 69
 25
 <210> 17
 30 <211> 70
 <212> RNA
 35 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen
 45 <400> 17
 CUCGAUCACC GUAAGGACAU UUACGUAAGU GUA AUGCGGC UUGUUUCCC 50
 50 CAUGCGUUUG CAUAUCUGUG 70
 55
 60
 65

DE 199 16 417 A 1

<210>	18		
<211>	69		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	18		
CUCGAUCACC GUAAGGACAU CUACAUAAAGU GUAAUGCGGC UUGUUUUCCC	50		20
CAUGCAUCUG CAUAUCUGU	69		
			25
<210>	19		
<211>	70		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	19		45
GUGCCAAAGG ACGUGUACCU UGAGCUCUAU GAGUACCUUC GACUUUAACG	50		
CAUGUCUGCA CUAAGGCAA	70		50
			55
			60
			65

<210> 20
<211> 70
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz
10
<220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 20
20 GUGCCAAAGG ACGUGUACCU UGAGCUCUAU GAGUACCUUC GACAUUAUCG 50
CAUGUCUGCA CCUAAGGCAA 70
25

<210> 21
30 <211> 70
<212> RNA
35 <213> künstliche Sequenz

<220>
40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
Selektionsverfahren gewonnen

45 <400> 21
GUGCCAAAGG AAGUGUACCU UGAGCUCUAU GAGUACCUUC GACUUUAACG 50
50 CAUGACUGCA CCUAAGGCAA 70
55
60
65

DE 199 16 417 A 1

<210>	22		
<211>	70		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	22		
GUGCCAAAGG AAGUGUACCU UGAGCUCUAU GAGUACCUUC AACUUUACG	50		20
CAUGACUGCA CCUAAGGCAA	70		
			25
<210>	23		
<211>	68		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	23		45
GCGCCAAAGG ACGUGUACCU UGAGCUCUAU GAGUACCCGA CUUUAACACA	50		
UGACUGCACC UAAGGCAA	68		50
			55
			60
			65

<210> 24
<211> 70
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 24
20 GUGCCAAAGG ACGUGUACCU UGAGCUAU AU GCGUACCUUC AACUUUAACG 50
CAUGUCUGCA CCUAAGGCAA 70

25

<210> 25
30 <211> 71
<212> RNA
35 <213> künstliche Sequenz

<220>
40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
Selektionsverfahren gewonnen

45 <400> 25
GCGCCAAAGG ACGUGUACCU UGAGCACUAU GCGUUCUUC GACUUUAACG 50
50 CAUGCCAUGC ACCUAAGGCA A 71

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210> 26
 <211> 70
 <212> RNA 5
 <213> künstliche Sequenz

<220> 10
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen 15

<400> 26
 CUCUGAUCCA GCAAGUACCG UAAGGAAACU UGGGGCUCCU ACAAGUUCGG 50 20
 CUUGUCUCC CAUCCCGAGU 70

<210> 27
 <211> 70 30
 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz 35

<220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes 40
 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 27 45
 UCUGAUCCAG CAAGUACCGU AAGGAAACUU GGGGCUCCU ACAAGUUCGG 50
 CUUGUCUCC CAUCCCGAGU 70 50

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210> 28
 <211> 70
 5 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz
 10 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 15 Selektionsverfahren gewonnen
 <400> 28
 20 UCUGAUCCAG CAAGUACCGU AAGAAACUUG UGCUCCCUAC AAGUUCGGCU 50
 UGUCUCCGA UCCCGAGU 68
 25
 <210> 29
 30 <211> 70
 <212> RNA
 35 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen
 45 <400> 29
 UCUGAUCCAU CAAGCACCGA AAGGAAACUU GGGGCUCCCU ACAAGUUCGG 50
 50 CUUGUCUCC CAUCCCGAGU 70
 55
 60
 65

DE 199 16 417 A 1

<210>	30		
<211>	70		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	30		
UCUGAUCCAG CAAGUACCGU AAGGAAACUU GGGGCUCCCU ACAAGUUCGG	50		20
CUUGUCUUCC GAUCCCGAGU	70		
			25
<210>	31		
<211>	69		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	31		45
UCUGAUCCAG CAAGUACCGU AAGAAACUUG GGGCUCCCUA CAAGUUCGGC	50		
UUGUCUUCCG AUCCCGAGU	69		50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 32
 <211> 70
 5 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz

 10 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 15 Selektionsverfahren gewonnen

 <400> 32
 20 UCUGAUCCAG CAAGCACCGU AAGGAAACUU GUGGCUCCCU ACAAGUUCGG 50
 CUUGUCUCC CAUCCCGAGU 70

 25

 <210> 33
 30 <211> 70
 <212> RNA
 35 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen

 45 <400> 33
 UCUGAUUCAG CAAGUACCGU AAGGAAACUU GUGGCUCCUU ACAAGUUCGG 50
 50 CUUGUCUCC GAUCCCGAGU 70

 55

 60

 65

DE 199 16 417 A 1

<210>	34		
<211>	70		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	34		
UCUGAUCCAG CAAGUACCGU AAGGAAACUU GGGGCUCCAU ACAAGUUCGG	50		20
CUUGUCUCC GAUCCCGAGU	70		
			25
<210>	35		
<211>	73		
<212>	RNA		30
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			35
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	35		
UCUGAUCCAG CAAGUACCGU AAGGAAACUU GUGGCUCCCU ACAAGUUCGG	50		45
CUUGUCUCC GAUCCCGAGU CUG	73		
			50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 36
<211> 70
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 36
20 UCUGAUCCAG CAAGUACCGU AAGGAAACUU GUGGCUCCCU ACAAGUUCGG 50
CUUGUCUUCC GAUCCCGAGU 70

25

<210> 37
30 <211> 70
<212> RNA
<213> künstliche Sequenz
35

<220>
40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
Selektionsverfahren gewonnen

45 <400> 37
UCUGAUCCAG CAAGUACCGU AAGGAAACUU GGGGCUCCCU ACAAGUUCGG 50
50 CUUGUCUUCC CAUCCCGAGU 70

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210>	38		
<211>	70		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	38		
UCUAAUCCAG CAAGUACCGU AAGGAAACUU GGGUCUCCCU ACAAUUUCGG	50		20
CUUGUCUUCC CAUCCCAAGU	70		
			25
<210>	39		
<211>	68		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	39		45
UCUGAUCCAG CAAGCACCGU AAGGAAACUU GGCUCCCUAC AAGUUCGGCU	50		
UGUCUUCCCA.UCCCGAGU	68		50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 40
 <211> 68
 5 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz
 10
 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 15 Selektionsverfahren gewonnen
 <400> 40
 20 UCCGAUUCGA CUUCCGCCAA CCAACAAACC CACUUUGUUA UUGAAGUACG 50
 UAACCUUCAA UGCAUGCC 68
 25
 30
 <210> 41
 <211> 69
 35 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz
 40
 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 45 Selektionsverfahren gewonnen
 <400> 41
 UCCGAUUCGA CUUCCGCCAA CCAACAAAU CACUUUGUUA UUGAAGUACU 50
 50 UAACCUUCAA UGCGCAUGC 69
 55
 60
 65

DE 199 16 417 A 1

<210>	42		
<211>	70		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	42		
UCCGAUUCGA CUUCCGCCAA CCAACAAACU CACUUUGUUA UUGAAGUACG	50		20
UAACCUUCAA UGCGCAUGCC	70		
			25
<210>	43		
<211>	70		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	43		45
UCCGAUUCGA CUUCCGCCAA CCAACAAACC CACUUUGUUA UUGAAGUACG	50		
UAACCUUCAA UGCGCAUGCC	70		50
			55
			60
			65

<210> 44
<211> 70
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 44
20 UCCGAUUCGA CUUCCGCCAA CCAACAAACC CACUUUGUUA UUGAAGUACG 50
UUACCUUCAA UGCGCAUGCC 70

25

<210> 45
30 <211> 66
<212> RNA
35 <213> künstliche Sequenz

<220>
40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
Selektionsverfahren gewonnen

45 <400> 45
ACCGCGCUCG CAUUGUUGUG UACUUCUACA CAACAAUGAU GAUUCUAGAG 50
50 GCCCCUGACC AUGCUA 66

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210>	46		
<211>	69		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	46		
CCCACCGCGC UCGCAUUGUU GUGUACUUCU ACACAACAAU GAUGAUUCAU	50		20
GAGGCCCCUG ACCAUGCUA	69		
			25
<210>	47		
<211>	69		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	47		45
CCUACCGCGC UCGCAUUGUU GUGUACUUCU ACACAACAAU GAUGAUUCAU	50		
GAGGCCCCUG ACCAUGCUA	69		50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 48
 <211> 71
 5 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz
 10
 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 15 Selektionsverfahren gewonnen
 <400> 48
 20 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCCAGG 50
 GGAGCGUUA UCGUACGUC U 71
 25
 <210> 49
 30 <211> 65
 <212> RNA
 35 <213> künstliche Sequenz
 <220>
 40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen
 45 <400> 49
 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AAGCUGAGCG 50
 50 UUAUUCGUAA CGUCU 65
 55
 60
 65

DE 199 16 417 A 1

<210> 50
 <211> 71
 <212> RNA 5
 <213> künstliche Sequenz

<220> 10
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen 15

<400> 50
 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCCACC 50
 CGAGCGUUA UCGUAACGUC U 71

<210> 51
 <211> 71 30
 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz 35

<220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes 40
 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 51 45
 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAUUAUAG UUACACACUG AGGCCCCACC 50
 CGAGCGUUA UCGUAACGUC U 71 50

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210> 52
<211> 70
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz
10 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen
<400> 52
ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCCACC 50
20 CCCUUUGCAU GUUUGCGACC 70

25
<210> 53
<211> 68
30 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz
35 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
40 Selektionsverfahren gewonnen
<400> 53
45 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCCCCC 50
CUUUUUGCAU GUCAUAAC 68

50

55

60

65

DE 199 16 417 A 1

<210>	54		
<211>	69		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	54		
ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCCAAA	50		20
AAAAUGCAUG AUCUGCUGU	69		
			25
<210>	55		
<211>	70		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	55		45
ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCCAAA	50		
AAAAAUGCAU GAUCUGCUGU	70		50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 56
 <211> 70
 5 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz

 10 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 15 Selektionsverfahren gewonnen

 <400> 56
 20 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AAGCCCGNAA 50
 CCCGUUUCGC AUGUCUUGAU 70

 25

 <210> 57
 30 <211> 69
 <212> RNA
 35 <213> künstliche Sequenz

 <220>
 40 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen

 45 <400> 57
 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCUGAAC 50
 50 ACGCAUGUGC UGCAUAAAU 69

 55

 60

 65

DE 199 16 417 A 1

<210> 58
 <211> 69
 <212> RNA 5
 <213> künstliche Sequenz

<220> 10
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen 15

<400> 58
 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCCUAU 50
 GCAUGCUCUA GCAUUUCGU 69

<210> 59
 <211> 70
 <212> RNA 35
 <213> künstliche Sequenz

<220> 40
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 Selektionsverfahren gewonnen 45

<400> 59
 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUAGAAACUG AAGCCCGCAA 50
 CCCGUUUCGC AUGUCUUGAU 70

<210> 60
<211> 70
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz
10
<220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 60
20 UCACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AAGCCCGCAA 50
CCCGUUUCGC AUGUCUUGAU 70
25

30 <210> 61
<211> 70
35 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz
40 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
45 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 61
50 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AAGCCCGCAA 50
CCCGUUUCGC AUGUCUUGAU 70
55
60
65

DE 199 16 417 A 1

<210>	62		
<211>	70		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	62		
ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCGACC 50			
CCCUUUGCAU GUUUGCGACC 70			
			20
			25
<210>	63		
<211>	70		30
<212>	RNA		
<213>	künstliche Sequenz		35
<220>			
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		40
<400>	63		45
ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AAGCCCGCAA 50			
CCCGUUUCGC AUGUCUUGAU 70			
			50
			55
			60
			65

DE 199 16 417 A 1

<210> 64
 <211> 70
 5 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz
 10
 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 15 Selektionsverfahren gewonnen
 <400> 64
 20 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AAGCCCGAAA 50
 CCCGUUUCGC AUGUCUUGAU 70
 25
 30
 <210> 65
 <211> 70
 35 <212> RNA
 <213> künstliche Sequenz
 40 <220>
 <223> durch in der Beschreibung angegebenes
 45 Selektionsverfahren gewonnen
 <400> 65
 50 GCACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCCUCC 50
 CUUUGCAUGC UCUGCUCUCA 70
 55
 60
 65

DE 199 16 417 A 1

<210>	66		
<211>	68		
<212>	RNA		5
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			10
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		15
<400>	66		
ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AGGCCCAACA	50		20
UGACCAUUC GCAUGCUC	68		
			25
<210>	67		30
<211>	69		
<212>	RNA		35
<213>	künstliche Sequenz		
<220>			40
<223>	durch in der Beschreibung angegebenes Selektionsverfahren gewonnen		45
<400>	67		
ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAUAG UUACAAACUG AAGCCCUAAC	50		50
GUUGCGCAUG UCUGUGUUA	69		
			55
			60
			65

<210> 68
<211> 67
5 <212> RNA
<213> künstliche Sequenz

10 <220>
<223> durch in der Beschreibung angegebenes
15 Selektionsverfahren gewonnen

<400> 68
20 ACACCUAGCU CGGUUUGCUA CGGCAAAUAG UUACAAACUG ACGCCCGCAA 50
AGCAUGCUUG CUUACAU 67

25

30 <210> 69
<211> 20
<212> RNA
35 <213> künstliche Sequenz

40 <220>
<223> synthetisiert

45 <400> 69
CUGCAGGCAU GCAAGCUUGG 20

50 <210> 70
<211> 20
<212> RNA
55 <213> künstliche Sequenz

<220>
60 <223> synthetisiert

<400> 70
65 GGGAUUGCA GCUCGGUACC-- 20

1. Gegen Nukleinsäure-spaltende Enzyme stabilisiertes Aptamer, welches amyloidspezifisch ist, oder Allele und/oder Derivate eines solchen Aptamers.
2. Aptamer nach Anspruch 1, welche gegen das Alzheimer β -Amyloid 4 (1-42) oder Teilsequenzen hiervon, insbesondere (1-40), spezifisch ist. 5
3. Aptamer nach Anspruch 1 oder 2 mit einer Loopstruktur.
4. Aptamer nach Anspruch 3, wobei die Loopstruktur vier Basen, vorzugsweise vier Uridine oder drei Uridine und ein Cytidin aufweist, vorzugsweise aus den vier Basen besteht.
5. Aptamer nach einem der Ansprüche 1-4 enthaltend eine Sequenz GUUU oder GUCU. 10
6. Aptamer nach einem der Ansprüche 1-5, enthaltend eine Sequenz aus der Gruppe bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO: 1 bis SEQ ID NO: 68
7. Aptamer nach Anspruch 6, wobei das 3'-Ende eine Primersequenz gemäß SEQ ID NO: 69 und/oder das 5'-Ende eine Primersequenz SEQ ID NO: 70 aufweist.
8. Aptamer nach Anspruch 7, wobei die Loopstruktur gebildet ist aus der Sequenz UUUC oder GUCU und der hierzu gegenüberliegenden Primersequenz AUUC und wobei die jeweilig mittleren beiden Basen ungepaart und die jeweilig äußeren Basen gepaart sind. 15
9. Aptamer nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die 2'-Hydroxylgruppe der Zuckergruppe eines oder mehrerer Pyrimidin-Nucleotide durch eine Flourid-, Amino- oder Methoxygruppe substituiert ist und/oder wobei in terminalen Phosphatgruppen ein Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom substituiert ist und/oder wobei das Aptamer ein Spiegelmer ist. 20
10. Verfahren zur Herstellung und/oder Isolierung eines Aptamers nach einem der Ansprüche 1-9, mit folgenden Verfahrensschritten:
- a) es wird ein randomisierter DNA-Pool geschaffen,
 - b) aus dem randomisierten DNA-Pool wird ggf. ein RNA-Pool erzeugt und einem Selektionskreislauf mit folgenden Schritten aufgegeben: 25
 - c) an das Amyloid oder eine Teilsequenz des Amyloids bindende RNA des RNA-Pools bzw. DNA des DNA-Pools wird selektiert,
 - d) selektierte RNA bzw. DNA wird amplifiziert,
 - e) die RNA bzw. DNA aus Stufe d) wird dem RNA-Pool bzw. DNA-Pool in der Stufe c) zugegeben, wobei die Stufen c)-e) so oft wiederholt werden, bis der Anteil in Stufe c) selektierter RNA bzw. DNA um weniger als 30 50%, vorzugsweise weniger als 10% ansteigt.
11. Aptamer nach einem der Ansprüche 1 bis 9, erhältlich durch ein Verfahren nach Anspruch 10.
12. Verwendung eines Aptamers nach einem der Ansprüche 1-9 oder einer Mischung solcher Aptamere zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Alzheimer, Spongiformen Enzephalopathie und Typ II Diabetes Mellitus. 35

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

FIG. 1

Gruppe 1
 B19* 5' ACUUCGUCUUGCAGCGCGGCUUGUCUUCUCCACAUCGCUUCUAUCGGUAUGACUCUUUUUCCGUAAGGUCA-3'
 B78 ACUUCGUCUUGCAGCGCGGCUUGUCUUCUCCACAUCGCUUCUAUCGGUAUGAC..UUUUUCCGUAAGGUCA

Gruppe 2
 B27 UUUACCGUAAGGCCUGUCUUCGUUUGACA.....GCGGCUUGUUGACCCUCACACUUUGUACCUCUGCCUG
 B55* UUUACCGUAAGGCCUGUCUUCGUUUGACA.....GCGGCUUGUUGACCCUCACACUUUGUACCUCUGCCAA
 B111 UUUACCGUAAGGCCUGUCUUCGUUUGACA.....GCGGCUUGUUGACCCUCACGCUUUGUCCCAUGCCCGUC
 B65 UUUACCGUAAGGCCUGUCUUCGUUUGACA.....GCGGCUUGUUGACCCACACACUUUGUCCCGGCGUGAG
 B69 UUUACCGUAAGGCCUGUCUUCGUUUGACA.....GCGGCUUGUUGACCCUCACGCUUUGUCCCGUGUACCUG
 B64 UUUACCGUAAGGCCUGUCAUCGUUUGACA.....GCGGCUUGUUGACCCUCCACUAUGUGUGCCUGUAUG

Gruppe 3
 B15 UCCACCGUAAGAUGUAAACUAUCGCGUAAA..GACGAAGUUUA..UGUGGCUUGUUUUCCC..ACCGCCUUGCC
 B61* UGUCCACCGUAAGAUGUAAACUAUCG..UAAA..GACGAAGUUUA..UGUGGCUUGUUUUCCC..ACCGCCUUGCC
 B108 UCCACCGUAAGAUGUAAACUAUCGCGUAAA..GACGAAGUUUA..UGUGGCUUGUU..CCC..ACCGCCUUGCC
 B76 UCCACCGUAAGAUGUAAACUAUCGCGUAAAAGACGAAGUUUA..UGUGGCUUGUUUUCCC..ACCGCCUUG
 B59 UCCACCGUAAGAUGUAAACUAUCGCGUAAA..GACGAAGUUUA..UGUGGCUUGUU..CCC..ACCGCCUUGCC
 B36 UGUCCACCGUA..GAUGUAAACUAUCGCGUAAA..G..GACGAAGUUUA..UGUGGCUUGUUUUCCC..AC..GCCUUG

Gruppe 4
 B5 CUCGAUCACCGUAAGGACAUUCUACGU.....AAGUGUAAUGCGGCUUGUUUUUCCCAUGCGUC..UGCAUAUCUGU
 B44 CUCGAUCACCGUAAGGACAUUCUACGU.....AAGUGUAAUGCGGCUUGUUUUUCCCAUGCGUC..UGCAUAUCUGU
 B124 CUCGAUCACCGUAAGGACAUUCUACGU.....AAGUGUAAUGCGGCUUGUUUUUCCCAUGCGU..UGCAUAUCUGU
 B28 CUCGAUCACCGUAAGGACAUUCUACU.....AAGUGUAAUGCGGCUUGUUUUUCCCAUGCAUC..UGCAUAUCUGU

Gruppe 5
 B2 GUGCCAAAGGACGUGUACCUUGAGCUCUAUGAGUACCUUCGACUUUAACG.....CAUG..UC..UGCACCUAAGGCAA
 B17 GUGCCAAAGGACGUGUACCUUGAGCUCUAUGAGUACCUUCGACAUUAACG.....CAUG..UC..UGCACCUAAGGCAA
 B43 GUGCCAAAGGAAGUGUACCUUGAGCUCUAUGAGUACCUUCGACUUUAACG.....CAUG..AC..UGCACCUAAGGCAA
 B50 GUGCCAAAGGAAGUGUACCUUGAGCUCUAUGAGUACCUUCACUUUAACG.....CAUG..AC..UGCACCUAAGGCAA
 B73 GCGCCAAAGGACGUGUACCUUGAGCUCUAUGAGUACC..CGACUUUAACA.....CAUG..AC..UGCACCUAAGGCAA
 B37* GUGCCAAAGGACGUGUACCUUGAGCUAUAUGCGUACCUUCACUUUAACG.....CAUG..UC..UGCACCUAAGGCAA
 B3 GCGCCAAAGGACGUGUACCUUGAGCUCUAUGCGUUCUUCGACUUUAACG.....CAUG..CCAUGCACCUAAGGCAA

"." = Verbinder, nicht dagegen unbekannt.

FIG. 2

Gruppe 1

a1 5' CUCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCC. UACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU-3'
 a4* UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a6 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAG. AAACUUGU. GCUCCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a7 UCUGAUCCAUCAAGCACCAGAAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a20 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a21 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAG. AAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a28 UCUGAUCCAGCAAGCACCAGAAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a34 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a48 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a56 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a62 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a84 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU
 a86 UCUGAUCCAGCAAGUACCGUAAGGAAACUUGGGGCUCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCAAGU
 a87 UCUGAUCCAGCAAGCACCAGAAAGGAAACUUGG. CUCCCUACAAGUUCGGCUUGUCUUCCCAUCCCGAGU

Gruppe 2

a14 UCCGAUUCGACUUCGG. CCAACCAACAACCCACUUGUUAUUGAAGUA. CGUAACCUUCAAUGC. . AUGCC
 a18* UCCGAUUCGACUUCGG. CCAACCAACAACCCACUUGUUAUUGAAGUA. CUUAACCUUCAAUGCGCAUGC
 a71 UCCGAUUCGACUUCGG. CCAACCAACAACCCACUUGUUAUUGAAGUA. CGUAACCUUCAAUGCGCAUGCC
 a80 UCCGAUUCGACUUCGG. CCAACCAACAACCCACUUGUUAUUGAAGUA. CGUAACCUUCAAUGCGCAUGCC
 a81 UCCGAUUCGACUUCGG. CCAACCAACAACCCACUUGUUAUUGAAGUA. CGUAACCUUCAAUGCGCAUGCC

Gruppe 3

a24 ACCGCGCUCGCAUUGUUGUACUUCUACACAACAUGAUGAUUCUAGAGGCCCCUGACCAUGCUA
 a36* CCCACCGCGCUCGCAUUGUUGUACUUCUACACAACAUGAUGAUUCUAGAGGCCCCUGACCAUGCUA
 a79 CCUACCGCGCUCGCAUUGUUGUACUUCUACACAACAUGAUGAUUCUAGAGGCCCCUGACCAUGCUA

Gruppe 4

a39 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCCCA. GGGGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a44 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAAGC. UGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a53* ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCCCA. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a82 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCCCA. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a46 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCCCA. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a13 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a59* ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCCCA. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a67 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCCCA. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a2 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a8 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a31 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a38 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a54* ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a61 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a68 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a69 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a70 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a11 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a16 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a19 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU
 a65 ACACCUAGCUC. GGUUUGCUACGGCAAAUAGUUAACAACUGAGGCC. CCGAGCGUUAUUGCUAACGUCU

". " = Verbindet, nicht dagegen unbekannt

FIG. 3

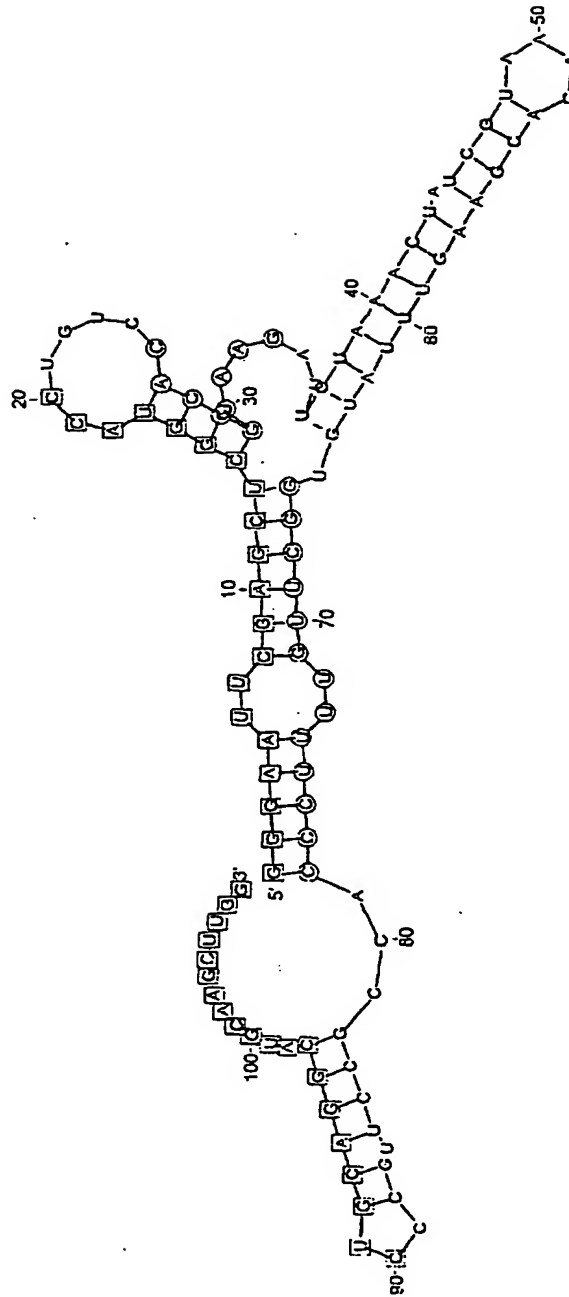


FIG. 4

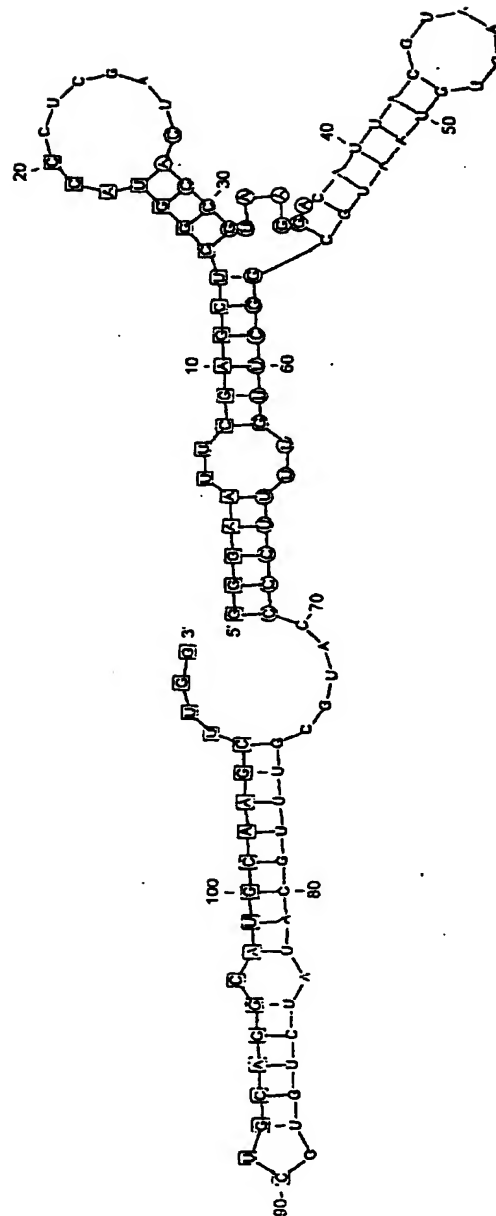


FIG. 5

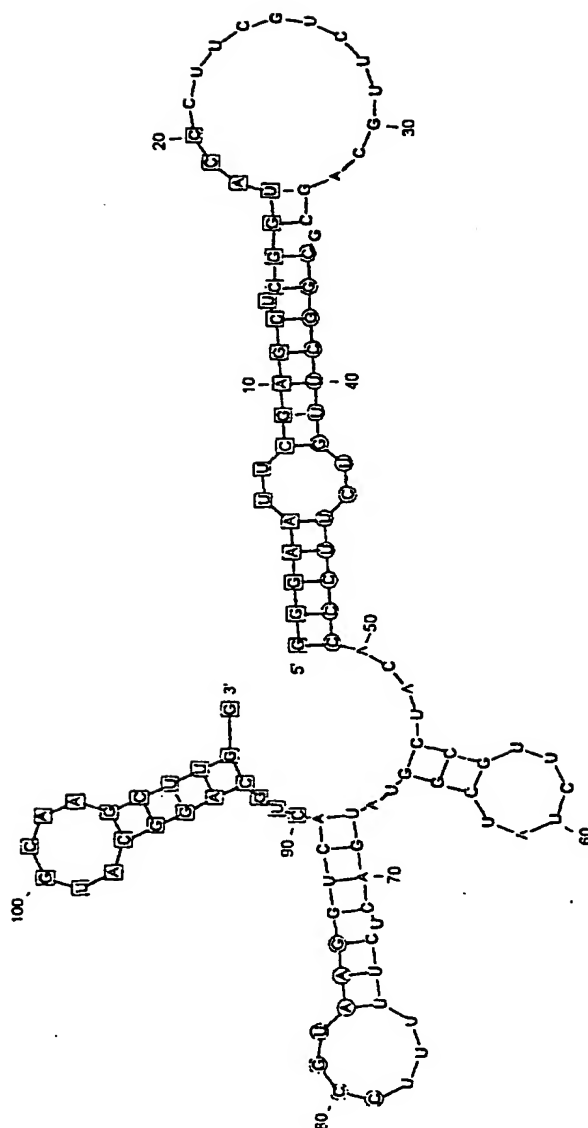


FIG. 6

